

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIVIA DE MOURA OLIVEIRA

**SISTEMÁTICA DOS GÊNEROS *DIDEMNUM* SAVIGNY, 1816 E
POLYSYNCRATON NOTT, 1892 (APLOUSOBRANCHIA: DIDEMNIDAE)**

CURITIBA

2018

LIVIA DE MOURA OLIVEIRA

**SISTEMÁTICA DOS GÊNEROS *DIDEMNUM* SAVIGNY, 1816 E
POLYSYNCRATON NOTT, 1892 (APLOUSOBRANCHIA: DIDEMNIDAE)**

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Zoologia do Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Moreira da Rocha.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Soares Barbeitos.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Oliveira, Livia de Moura

Sistemática dos gêneros *Didemnum* Savigny, 1816 e *Polysyncraton* Nott, 1892 (Aplousobranchia: Didemnidae). / Livia de Moura Oliveira. – Curitiba, 2018.

221 p. : il. ; 30cm.

Orientadora: Rosana Moreira da Rocha

Co-orientador: Marcos Soares Barbeitos

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Ascidiacea. 2. Taxonomia. 3. Tunicata. I. Título. II. Rocha, Rosana Moreira da. III. Barbeitos, Marcos Soares. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20. ed.) 596.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LIVIA DE MOURA OLIVEIRA** intitulada: **Sistemática dos gêneros *Didemnum Savigny, 1816* e *Polysyncraton Nott, 1892* (Aplousobranchia: Didemnidae)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

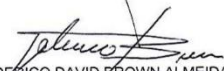
Curitiba, 22 de Fevereiro de 2018.


ROSANA MOREIRA DA ROCHA
Presidente da Banca Examinadora


MARCIO ROBERTO PIE
Avaliador Interno


WALTER ANTONIO PEREIRA BOEGER
Avaliador Externo


GABRIEL AUGUSTO RODRIGUES MELO
Avaliador Externo


FEDERICO DAVID BROWN ALMEIDA
Avaliador Externo

Para meus pais José e Leodete

Agradecimentos

Aos meus pais, José e Leodete, que me apoiaram a continuar com meu objetivo de vida. Em especial a minha mamis que sempre escuta minhas alegrias e apereios, além de me incentivar a realizar meus sonhos.

À Dra. Rosana M. Rocha, minha orientadora, por todo incentivo, puxões de orelha, por todas as oportunidades recebidas, pelo conhecimento adquirido e confiança depositada em mim.

À Dr. Marcos S. Barbeitos, meu co-orientador, por me aceitar como aluna e pela disponibilidade quando iria tirar minhas dúvidas. Saiba que sempre sai tonta de sua sala com as enxurradas de informações fornecidas a cada dúvida respondida!

Aos padrinhos Kátia e Zezo, minha família curitibana e de coração, por todo apoio e por me fornecerem um lar. Por todo o carinho compartilhado que fez diminuir um pouco a saudade de casa.

Ao Dr. Bert W. Hoeksema, grande criança, por aceitar o desafio de me orientar durante meu doutorado sanduíche. Por sua companhia durante todos os 11 meses que passei longe de casa e, principalmente, por não medir esforços para que meu projeto ocorresse como planejado.

Ao Dr. Arjan Gittenberger por me co-orientar durante o doutorado sanduíche, pelo conhecimento compartilhado, por todo o esforço para que minhas sequências se tornassem disponíveis e pelo uso de seu laboratório durante as atividades moleculares.

Ao Dr. Leen van Ofwegen, Dr. Charles Fransen e Dr. Ronald Vonk pelas risadas e companhias durante o almoço.

Ao Dr. Gustav Paulay pelo empréstimo de espécimes do Museu da Flórida.

À Dr. Miranda Lowe e Andrew Cabrinovic por me receberem no Museu de História Natural de Londres.

À Dra. Sthephania Rodriguez por ser minha anfitriã no Museu Americano de História Natural e por fornecer seu laboratório para desenvolver minhas atividades.

À Dra. Linda Cole por me receber tão bem no Museu Nacional de História Natural - Instituição Smithsonian e pela preocupação em me fazer companhia durante o almoço.

À Dra. Françoise Monniot pelo empréstimo das lâminas de *Polysyncraton* do Museu Nacional de História Natural de Paris.

À Dra. Noa Shenkar pelo envio de amostras do Museu Steinhardt de História Natural e Centro de Pesquisa Nacional, Tel-Aviv University, Israel.

Ao Professor Mario Navarro pelo uso dos equipamentos em seu laboratório.

À Paula Borges, técnica do laboratório de Biologia Molecular da UFPR, pela ajuda durante meu aprendizado e conversas que ajudaram a passar o tempo durante as extrações de DNA.

À Iris Sampaio, amiga que o Naturalis me deu, pela amizade, troca de conhecimento e incentivo para continuar a escrever, mesmo quando o cansaço não

permitia. Separadas pelo Oceano Atlântico, mas juntas pela língua materna, risos, coração e por uma simples tela de touch screen.

À Salise Brandt por sua amizade, companhia durante os quatro anos de doutorado, por escutar meus lamúrios e também minhas alegrias.

Aos colegas Labimar por compartilhar momentos de distrações no laboratório e pelo café da tarde que forneceram muitas risadas.

Ao colega de laboratório e amigo para a vida Rodolfo Barros pelos cafezinhos da tarde produtivos e compartilhamento de experiências. Pela ajuda fornecida no início de minhas atividades moleculares e por me fazer crescer profissionalmente.

Ao amigo Diones Krinski que mesmo longe se fez presente, me apoiando e incentivando a não desistir.

A japinha mais querida que já conheci, Nadia Bonnet, por suas risadas, companhia na hora do café e troca de experiências.

Aos colegas do departamento, Ana Winder, Andrea Desiderato, Camilla Felipe, Larissa Ajala, Aluska Santos, Isaac, Mila, Alê, Samara e Brunno pelos momentos de alegrias, descanso e desabafos.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da UFPR por disponibilizar o equipamento para tirar fotos das estruturas calcárias mais lindas desse universo.

Ao CNPq por me financiar durante os quatro anos de doutoramento.

“O maior inimigo do conhecimento não é
ignorância, mas a ilusão do
conhecimento.”

“Inteligência é a habilidade de se adaptar
as mudanças.”

Stephen Hawking

RESUMO

Didemnidae é a maior família dentro de Ascidiacea e faz parte da ordem Aplousobranchia. É formada por organismos coloniais que possuem o corpo dividido em duas partes: um tórax, o qual contém a faringe e um abdome, no qual encontram-se o intestino e as gônadas. A família se caracteriza por conter colônias com canais cloacais complexos, tamanho reduzido dos zooides, geralmente menor que 1 mm de comprimento, e presença de espículas na túnica, exceto em *Diplosoma* no qual estas estruturas estão ausentes. Há nove gêneros dentro de Didemnidae, dos quais *Didemnum* e *Polysyncraton* são os mais diversos. Este trabalho tem por objetivos estudar morfologicamente exemplares de *Didemnum* e *Polysyncraton* de várias regiões do mundo, com ênfase na descrição de novas espécies na costa brasileira e separar possíveis espécies crípticas, utilizando informações morfológicas e moleculares. Foram analisados 221 exemplares, de 53 espécies distintas, das quais 10 são novas espécies. As análises realizadas para a reconstrução filogenética molecular foram as de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana e para a delimitação de espécies, Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD), Barcode Index Number System (BIN) e Bayesian Poisson Tree Processes (BPTP). Embora tenha-se usado apenas um gene (COX1), as análises moleculares e de delimitação de espécies forneceram evidências suficientes para detectar grupos de espécies crípticas. São apresentadas as descrições formais das 10 espécies novas e complementação das descrições de espécies conhecidas.

Palavras-chave: Taxonomia, delimitação de espécies, Tunicata, ascídias, COX1

ABSTRACT

Didemnidae is the largest family within the Ascidiacea and is a part of the Order Aplousobranchia. It contains colonial organisms that have the body divided into two parts: a thorax, which contains the pharynx and an abdomen, in which the intestine and the gonads are found. The family is characterized by colonies with complex cloacal channels, small size of the zooids, generally smaller than 1 mm, and presence of spicules in the tunic, except for *Diplosoma* in which these structures are absent. There are nine genera within Didemnidae, of which *Didemnum* and *Polysyncraton* are the most diverse. This study aims to study the morphology of species from several regions around the world in *Didemnum* and *Polysyncraton* with emphasis on the description of new species from the Brazilian coast and on disentangling cryptic species complexes using morphological and molecular information. A total of 221 specimens from 53 different species were analysed, of which 10 are new species. Molecular phylogeny reconstruction was conducted using the Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses, while species delimitation analyses were performed through Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD), Barcode Index Number System (BIN), Bayesian Poisson Tree Processes (BPTP) and morphology. Although only one marker has been used, a fragment of the cytochrom oxidase 1 gene, molecular analyses and species delineation procedures brought enough evidence to detect groups of cryptic species. Formal descriptions of the 10 new species and complementation of the descriptions of known species are presented.

Key-words: Taxonomy, species delimitation, Tunicata, ascidians, COX1

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
Referências.....	17
Capítulo 1: <i>Didemnum</i> species (Ascidiacea, Didemnidae) of several museums with a complementation of some descriptions.....	22
Capítulo 2: Taxonomia integrativa e delimitação das espécies <i>Didemnum calliginosum</i> , <i>D.</i> <i>cineraceum</i> e <i>D. vanderhorsti</i> (Ascidiacea, Didemnidae).....	80
Capítulo 3: Além de <i>Didemnum duplicatum</i> e <i>Didemnum galacteam</i> (Ascidiacea: Didemnidae): taxonomia integrativa revela mais espécies com dois folículos testiculares no Atlântico Oeste	127
Capítulo 4: <i>Polysyncraton</i> (Ascidiacea: Didemnidae): a re-study of some type specimens and description of new species	165
CONCLUSÕES GERAIS	208
REFERÊNCIAS	209

INTRODUÇÃO

Didemnidae é a maior família em *Ascidacea* com 599 espécies registradas em 9 gêneros (Fig. 1) (Shenkar *et al.* 2018). Também é a mais diversa em águas tropicais rasas (Kott 1969; Monniot *et al.* 1991; Sluiter 1909), diminuindo sua diversidade em direção aos polos (Kott 2001). Esta família se caracteriza por ser formada por organismos coloniais com canais cloacais complexos, tamanho reduzido dos zooides, que em sua grande maioria medem menos de 1 mm de comprimento, e presença de espículas na túnica, com exceção de *Diplosoma* no qual estas estruturas estão ausentes (Kott 1962, 2001; Monniot *et al.* 1991; Van Name 1945).

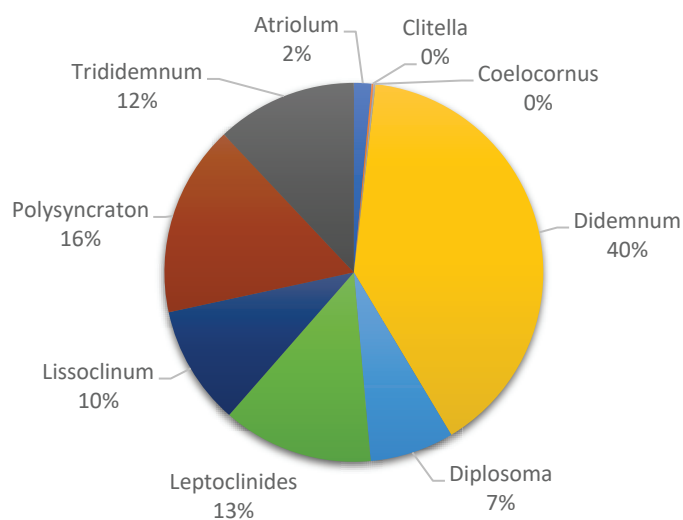


Figura 1: Porcentagem relativa do número de espécies nos gêneros de *Didemnidae*.

Didemnum Sluiter, 1816, por ser o gênero mais diverso dentro de *Didemnidae* com 237 espécies válidas (~40 %), é considerado o mais difícil do ponto de vista taxonômico (Millar 1982), pois a coloração da colônia se perde logo após a fixação, deixando-as brancas devido a presença de espículas na túnica. Os zooides nem sempre são removidos por inteiro e as gônadas e larvas são encontrados em vários estágios de desenvolvimento ou até mesmo em estágio de regressão (About *et al.* 1997; Monniot *et al.* 1991). Já *Polysyncraton*, embora não seja tão diverso quanto *Didemnum*, é o segundo maior gênero dentro da mesma família com 98 espécies válidas (cerca de 16%), melhor

representadas nas águas australianas (Kott 2001). Estes animais podem conter simbiossomas na túnica (algas unicelulares ou *Prochloron*) que fornecem uma coloração verde a colônia (Alberte *et al.* 1986; López-Legentil *et al.* 2011; Oka *et al.* 2005).

Seis gêneros *Didemnoides* Drasche, 1883, *Diplosomoides* Herdman, 1886, *Hypurgon* Sollas, 1903, *Leptoclinum* Milne Edwards, 1842, *Sarcodidemnoides* Oka & Willey, 1892 e *Tetradidemnum* Della Valle, 1841 foram sinonimizados com *Didemnum*. Cerca de 57% do número de espécies originalmente descritas em *Didemnum* foram transferidas para outros gêneros, especialmente *Trididemnum* (~25% do total de espécies transferidas). Por outro lado, nenhum outro gênero foi sinonimizado com *Polysyncraton*, criado por Nott em 1892. Posteriormente, este gênero foi considerado como subgênero de *Didemnum* por Berrill (1932), Hastings (1931), Millar (1962), Tokioka (1953) e Van Name (1921, 1945), e depois passou novamente à categoria de gênero (Kott 1962b; Lafargue 1968; Monniot 1974). Em *Polysyncraton* apenas 4% das espécies foram sinonimizadas, indicando que a delimitação de espécies neste gênero parece ser mais estável que em *Didemnum*, gênero no qual existem 31% de sinônimas (Fig. 2).

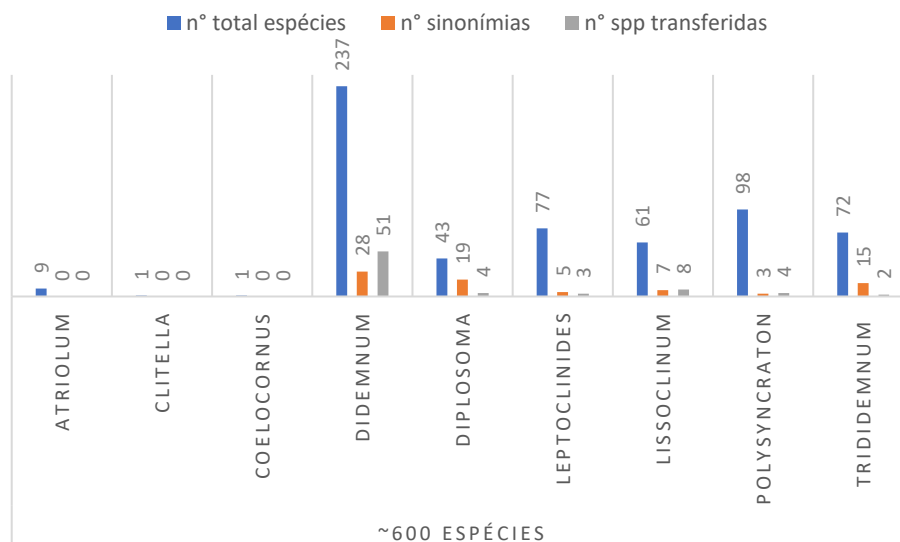


Figura 2: Número total de espécies válidas, número de sinônimas e número de espécies que foram transferidas a outros gêneros, em cada gênero de Didemnidae.

Existem muitas dificuldades em delimitar espécies crípticas e em estabelecer relações filogenéticas com base em caracteres morfológicos dentro de Didemnidae. A pequena variação interespecífica de caracteres nos zooides aliada a uma grande variação em número de folículos testiculares e voltas do espermiduto nas gônadas, número de pares de ampolas nas larvas e a variação intraespecífica das espículas e semelhanças entre estas encontradas em espécies diferentes (Kott 1962b; Monniot 1984) nos permite ter uma atenção mais cuidadosa em relação as estruturas presentes tanto nas colônias quanto nos zooides e larvas. A anatomia dos zooides e larvas de *Didemnum* e *Polysyncraton* é semelhante, diferenciando-se pela presença em *Polysyncraton* de uma lingueta atrial, maior número de folículos testiculares e maior número de pares de ampolas na larva, que também é maior e geralmente gemípara (About *et al.* 1997; Kott 2001; Monniot *et al.* 1991).

Apesar de *Didemnum* ser um gênero com ampla distribuição geográfica, o conhecimento existente ainda é restrito em algumas regiões, com algumas áreas mais estudadas e outras estudadas esporadicamente. Avaliando algumas dessas regiões, verificamos que existem apenas 13 espécies registradas no Caribe (Monniot 1983; Rocha *et al.* 2010; Rocha *et al.* 2012), 20 no Brasil (Dias *et al.* 2013; Paiva *et al.* 2015; Rocha *et al.* 2011, 2012, 2015), 13 na costa oeste da África (Lafargue & Wahl 1986; Monniot *et al.* 2001; Rocha *et al.* 2012), 23 na costa leste da África (Michaelsen 1920; Monniot 1997; Monniot *et al.* 2001b), 16 no Mar Mediterrâneo (Médioni 1970; Lafargue *et al.* 1986, Lafargue & Wahl 1987), 3 no Mar Vermelho (Michaelsen 1920; Pérès 1962), 104 na Austrália (Herdman 1899; Kott 2002a, 2003, 2004, 2007), 11 na Nova Zelândia (Millar 1982; Kott 2002b) e 4 na Antártica (Primo & Vázquez 2009). Já para o gênero *Polysyncraton*, verificamos que existem apenas 2 espécies registradas no Caribe (Van Name 1945; Monniot 1984; Rocha *et al.* 2012), 2 no Brasil (Paiva *et al.* 2015; Rocha *et al.* 2011; Rocha *et al.* 2012; Dias *et al.* 2013), 6 na costa oeste da África (Pérès 1949; Lafargue & Wahl 1986; Monniot & Monniot 1994; Rocha *et al.* 2012), 6 na costa leste da África (Michaelsen 1920; Monniot & Monniot 1997; Monniot *et al.* 2001), 5 no Mar Mediterrâneo (Pérès 1958; Médioni 1970; Lafargue *et al.* 1986, Lafargue & Wahl 1987), 64 na Austrália (Kott 1962, 2001, 2002a, 2003, 2004a, 2004b, 2004c, 2005, 2007, 2008), 3 na Nova Zelândia (Brewin 1956; Millar 1982) e 1 na Antártica (Primo & Vázquez 2009). Mesmo assim, o número de espécies de didemnídeos registradas é bem representativo nos trabalhos mais utilizados neste estudo (Herdman 1886; Kott 2001;

Lotufo 2002; Michaelsen 1923; Millar 1977; Monniot *et al.* 2001a; Monniot & Monniot 1987a; Van Name 1945; Sluiter 1909). Um bom exemplo para demonstrar isso é o trabalho resultante da Expedição Siboga (Sluiter 1909), no qual foi realizado um levantamento da fauna de ascídias na Indonésia. A fauna de Didemnidae representa quase 60% das espécies de ascídias reportadas por Sluiter (1909). Em 1945, Van Name publicou um inventário da fauna de Ascidiacea proveniente de várias coletas realizadas ao longo de todo o continente americano. Se compararmos o número total de espécies de ascídias com o número de espécies de didemnídeos reportado por ele, esse valor não representa nem 10% da fauna de Ascidiacea desta região. Estudos realizados no Atlântico Sul nos últimos 25 anos (Lotufo & Dias 2007; Paiva *et al.* 2015; Rocha *et al.* 2015; Rocha & Monniot 1993) revelaram que só no Brasil existem, praticamente, o mesmo número de espécies registradas por Van Name (1945) para todo o continente americano, mostrando que o valor encontrado por Van Name estava mesmo abaixo da média esperada (Fig. 3).

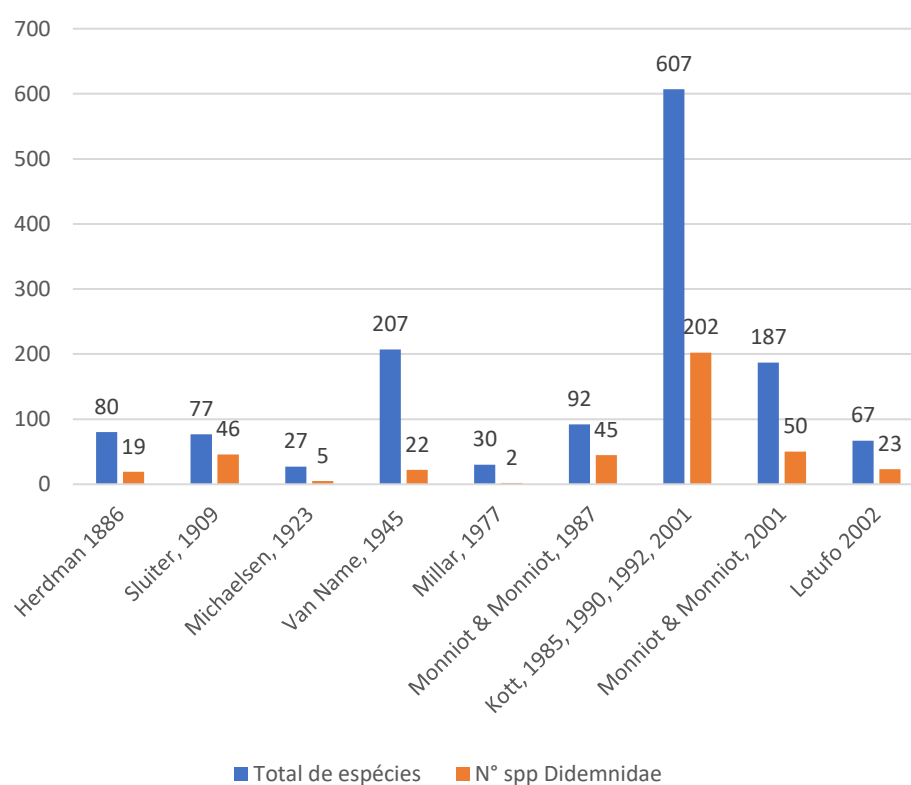


Figura 3: Número de espécies de Ascidiacea em comparação ao número de didemnídeos em cada estudo publicado. Os estudos foram escolhidos por tratarem-se de referências utilizadas com maior frequência neste estudo.

A utilização de ferramentas moleculares para o estudo taxonômico em ascídias, embora recente, vem ocorrendo com mais frequência, visando resolver questões de identificação ou elaborar hipóteses sobre a evolução e distribuição geográfica desses animais (Barros *et al.* 2009; Oliveira *et al.* 2017; Rocha *et al.* 2011). As análises filogenéticas moleculares podem ajudar a esclarecer e a complementar a identificação taxonômica das espécies (Leduc & Sinniger 2017; Stefaniak 2009). Assim, a combinação de informações genéticas com informações morfológicas para delimitar espécies, torna-se cada vez mais comum (Cruz-Barraza *et al.* 2012; Gutiérrez-Valencia *et al.* 2017; Heethoff *et al.* 2011; Padula *et al.* 2014; Razkin *et al.* 2017; Weis & Melzer 2012).

Um levantamento das sequências de Didemnidae foi realizado através dos bancos de dados genético online GenBank e BOLD e constatou-se que dados de sequências moleculares tornaram-se disponíveis a partir da virada do século com as primeiras sequências depositadas por Stach & Turbeville (2002). Até os dias atuais, foram realizados estudos moleculares com 60 espécies de didemnideos em seis gêneros, dos quais *Didemnum*, *Diplosoma*, *Lissoclinum*, *Trididemnum*, *Polysyncraton* e *Leptoclinides* tiveram 22, 10, 11, 13, 3 e 1 espécies estudadas, respectivamente. Das 22 espécies de *Didemnum*, quatro (*D. cineraceum*, *D. granulatum*, *D. perlucidum* e *D. psammatodes*) possuem registros no litoral brasileiro.

Em didemnideos, estudos com CO1 foram realizados para separar geneticamente populações de espécies invasoras e com ampla distribuição geográfica (Hess *et al.* 2009; Stefaniak 2009) e para esclarecer a identidade e/ou distribuição geográfica de espécies (E. Hirose *et al.* 2009; Hirose & Hirose 2009; M. Hirose *et al.* 2010), sendo estes últimos ainda bastante restritos. O presente estudo é pioneiro no uso de métodos formais de delimitação de espécies para identificar possíveis espécies crípticas em Ascidiacea.

Dessa forma, este trabalho foi realizado com o intuito de reavaliar a identidade de espécies de *Didemnum* e *Polysyncraton*, determinar espécies crípticas, bem como descrever novas espécies para a costa brasileira; analisar morfologicamente as espécies de várias regiões ao redor do mundo, depositadas em diversos museus e avaliar a variabilidade genética do marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) entre as espécies de *Didemnum*.

A revisão foi baseada no estudo de espécimes presentes em oito coleções de museus americanos e europeus, a saber: AMNH, Museu Americano de História Natural, Nova Iorque, Estados Unidos; DZUP, Coleção de Ascidiacea do Departamento de

Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Brasil; LIPY, Coleção de Tunicata do Laboratório de Invertebrados Marinhos Paulo Young, Universidade Federal da Paraíba, Brasil; MNHN, Museu Nacional de História Natural, Paris, França; NHM, Museu de História Natural, Londres, Inglaterra; SMNH, Museu Steinhardt de História Natural e Centro de Pesquisa Nacional, Tel-Aviv University, Israel; USNM, Museu Nacional de História Natural - Instituição Smithsonian, Washington DC, USA; ZMA, Museu de Zoologia de Amsterdam, parte do Centro de Biodiversidade Naturalis, Países Baixos.

Referências

- Barros, R.C., Rocha, R.M. & Pie, M.R. (2009) Human-mediated global dispersion of *Styela plicata* (Tunicata, Ascidiacea). *Aquatic Invasions* 4, 45–57.
- Berrill, N.J. (1932) Ascidians of the Bermudas. *Biological Bulletin of Marine Biology Laboratory (Woods Hole)* 62, 77–88.
- Cruz-Barraza, J.A., Carballo, J.L., Rocha-Olivares, A., Ehrlich, H. & Hog, M. (2012) Integrative taxonomy and molecular phylogeny of genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. *PLoS ONE* 7.
- Dias, G.M., Rocha, R.M., Lotufo, T.M.C. & Kremer, L.P. (2013) Fifty years of ascidian biodiversity research in São Sebastião, Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 273–282.
- Gutiérrez-Valencia, J., Gutiérrez, Y. & G. Dias, L. (2017) Species delimitation in the crypsis-defended and polymorphic stick insects of the genus *Libethra* (Phasmatodea, Diapheromeridae). *Zoologica Scripta* 46, 693–705.
- Hastings, A.B. (1931) Tunicata. Great Barrier Reef Expedition 1928–29. *Scientific Reports* 4, 69–109.
- Heethoff, M., Laumann, M., Weigmann, G. & Rasputnig, G. (2011) Integrative taxonomy: Combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Frontiers in zoology* 8, 2.
- Herdman, W.A. (1886) Report on the tunicata collected during the voyage of H.M.S.

- “Challenger” during the years 1873-1876. Part. II. Ascidiaceae compositae. *Rep. Voy. Challenger* 14, 1–399.
- Hess, J.E., Swalla, B.J. & Moran, P. (2009) New molecular markers to genetically differentiate populations of *Didemnum vexillum* (Kott, 2002) - an invasive ascidian species. *Aquatic Invasions* 4, 299–310.
- Hirose, M. & Hirose, E. (2009) DNA barcoding in photosymbiotic species of *Diplosoma* (Ascidiacea: Didemnidae), with the description of a new species from the southern Ryukyus, Japan. *Zoological Science* 26, 564–568.
- Hirose, M., Nozawa, Y. & Hirose, E. (2010) Genetic isolation among morphotypes in the photosymbiotic didemnid *Didemnum molle* (Ascidiacea, Tunicata) from the Ryukyus and Taiwan. *Zoological science* 27, 959–964.
- Hirose, M., Yokobori, S. & Hirose, E. (2009) Potential speciation of morphotypes in the photosymbiotic ascidian *Didemnum molle* in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Coral Reefs* 28, 119–126.
- Kott, P. (1962) The Ascidiaceae of Australia III. Aplousobranchiata Lahille: Didemnidae Giard. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 13, 265–334.
- Kott, P. (1969) Antarctic Ascidiacea. *Antarctic Research Series* 13, 1–239.
- Kott, P. (2001) The Australian Ascidiacea. Part. 4: Aplousobranchia (3), Didemnidae. *Memoirs of the Queensland Museum* 47, 1–410.
- Kott, P. (2002a) A complex didemnid ascidian from Whangamata, New Zealand. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 82, 625–628.
- Kott, P. (2002b) Ascidiacea (Tunicata) from Darwin, Northern Territory, Australia. *The Beagle, Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory* 18, 19–55.
- Kott, P. (2003) New syntheses and new species in the Australian Ascidiacea. *Journal of Natural History* 37, 1611–1653.
- Kott, P. (2004) New and little-known species of Didemnidae (Ascidiacea, Tunicata) from Australia (part 1). *Journal of Natural History* 38, 731–774.
- Kott, P. (2007) New and little-known species of Didemnidae (Ascidiacea, Tunicata) from Australia (part 4). *Journal of Natural History* 41, 1163–1211.

- Lafargue, F. (1968) Les peuplements sessiles de L'Arquipel de Glénan. II. Les Didemnidae - Systematique - Écologie. *Vie Milieu* 19, 353–446.
- Lafargue, F. & Wahl, M. (1987) The didemnid ascidian fauna of France. *Annales de l'Institut Océanographique, Paris* 63, 1–46.
- Lafargue, F., Ramos, A.A., Turon, X., Banaigs, B. & Wahl, M. (1986) The littoral ascidians of the Spanish Mediterranean. I. From Port Bou to the Islas Medas. *Vie Milieu* 36, 133–139.
- Lotufo, T.M.C. (2002) Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Lotufo, T.M.C. & Dias, G.M. (2007) *Didemnum galacteum*, a new species of white didemnid (Chordata: Ascidiacea: Didemnidae) from Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 120, 137–142.
- Médioni, A. (1970) Ascidies du benthos rocheux de Banyuls-sur-Mer. Didemnidae (Ascidies composées). *Vie Milieu* 1A, 25–48.
- Michaelson, W. (1920) Die Krikobranchien Asciden des westlichen Indischen Ozeans: Didemniden. *Jahrbuch der Hamburgischen wissenschaftlichen Anstalten* 37, 1–76.
- Michaelson, W. (1923) Neue und altbekannte Asciden aus dem Reichsmuseum zu Stockholm. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Staatsinstitut und Zoologischen Museum Hamburg* 40, 1–60.
- Millar, R.H. (1962) Further descriptions of South African ascidians. *Annals of the South African Museum* 46, 113–221.
- Millar, R.H. (1977) Ascidians (Tunicata: Ascidiacea) from the Northern and North-Eastern Brazilian shelf. *Journal of Natural History* 11, 169–223.
- Monniot, C. (1997) Ascidies phlébobranches du canal du Mozambique. *Zoosystema* 19, 557–571.
- Monniot, C. & Monniot, F. (1987) Les ascidies de Polynésie Française. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Zoologie* 136, 1–155.
- Monniot, C., Monniot, F. & Laboute, P. (1991) *Coral Reef Ascidians of New Caledonia*. ORSTOM, Paris.

- Monniot, C., Monniot, F., Griffiths, C.L. & Schleyer, M. (2001) South African Ascidians. *Annals of the South African Museum* 108, 1–141.
- Monniot, F. (1974) Ascidies littorales et bathyales récoltées au cours de la campagne Biaçores: Aplousobranches. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle* 251, 1287–1326.
- Monniot, F. (1983) Ascidies littorales de Guadeloupe I. Didemnidae. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris* 5A, 5–49.
- Monniot, F. (1984) Ascidies littorales de Guadeloupe VIII. Questions de systématique évolutive posées par les Didemnidae. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris* 6A, 885–905.
- Oliveira, F.A.S., Michonneau, F. & Lotufo, T.M.C. (2017) Molecular phylogeny of Didemnidae (Ascidacea: Tunicata). *Zoological Journal of the Linnean Society* XX, 1–10.
- Padula, V., Araujo, A. K., Matthews-Cascon, H. & Schrodl, M. (2014) Is the Mediterranean Nudibranch *Cratena Peregrina* (Gmelin, 1791) Present on the Brazilian Coast? Integrative Species Delimitation and Description of *Cratena Minor* N. Sp. *Journal of Molluscan Studies*, 1–10.
- Paiva, S. V., Oliveira Filho, R.R. De & Lotufo, T.M.D.C. (2015) Ascidians from Rocas Atoll, northeast Brazil. *Frontiers in Marine Science* 2, 1–20.
- Pérès, J.M. (1962) Sur une collection d'ascidies de la côte israélienne de la Mer Rouge et de la péninsule du Sinai. *Bulletin of Sea Fisheries Research Station, Haifa* 30, 39–47.
- Primo, C. & Vázquez, E. (2009) Antarctic ascidians: an isolated and homogeneous fauna. *Polar Research* 28, 403–414.
- Razkin, O., Gómez-Moliner, B.J., Vardinoyannis, K., Martínez-Ortí, A. & Madeira, M.J. (2017) Species delimitation for cryptic species complexes: case study of *Pyramidula* (Gastropoda, Pulmonata). *Zoologica Scripta* 46, 55–72.
- Rocha, R.M. & Monniot, F. (1993) *Didemnum rodriguesi* sp. nov., a new didemnid tunicate common to southern Brazil and New Caledonia. *Annales de l'Institut Océanographique* 69, 261–265.

- Rocha, R.M., Dias, G.M. & Lotufo, T.M.C. (2011) Checklist das ascídias (Tunicata, Ascidiacea) do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 11, 749–759.
- Rocha, R.M., Neves, I.M. & Gamba, G.A. (2015) New species of Didemnidae (Tunicata: Ascidiacea) from the tropical coast of Brazil. *Zootaxa* 3905, 381–396.
- Rocha, R.M., Zanata, T.B. & Moreno, T.R. (2012) Keys for the identification of families and genera of Atlantic shallow water ascidians. *Biota Neotropica* 12, 269–303.
- Rocha, R.M., Guerra-Castro, E., Lira, C., Pauls, S.M., Hernández, I., Pérez, A., Sardi, A., Pérez, J., Herrera, C., Carbonini, A.K., Caraballo, V., Salazar, D., Diaz, M.C. & Cruz-Motta, J.J. (2010) Inventory of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the National Park La Restinga, Isla Margarita, Venezuela. *Biota Neotropica* 10, 0–10.
- Sluiter, C.P. (1909) Die Tunicaten der Siboga Expedition. Pt II. Die merosomen Ascidien. *Siboga-Expeditie* 56B, 1–112.
- Stach, T. & Turbeville, J.M. (2002) Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters. *Molecular phylogenetics and evolution* 25, 408–428.
- Stefaniak, L. (2009) Genetic conspecificity of the worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002. *Aquatic Invasions* 4, 29–44.
- Tokioka, T. (1953) Ascidians of Sagami Bay. *Tokko, Iwanami Shoten*, 1–313.
- Van Name, W.G. (1921) Ascidians of the West Indian region and Southeastern United States. *Bulletin American Museum of Natural History* 44, 283–494.
- Van Name, W.G. (1945) The North and South American ascidians. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 84, 1–476.
- Weis, A. & Melzer, R.R. (2012) How did sea spiders recolonize the Chilean fjords after glaciation? DNA barcoding of Pycnogonida, with remarks on phylogeography of *Achelia assimilis* (Haswell, 1885). *Systematics and Biodiversity* 10, 361–374.

Capítulo 1: *Didemnum* species (Ascidiacea, Didemnidae) of several museums with a complementation of some descriptions

LIVIA DE MOURA OLIVEIRA, BERT W. HOEKSEMA, ARJAN GITTENBERGER
& ROSANA MOREIRA DA ROCHA

ABSTRACT. *Didemnum* Savigny, 1816 is the most diverse genus in Didemnidae and the second one in the whole class. It has 237 valid species, better represented in Australian waters. Several specimens originated from important oceanographic expeditions such as the Siboga and Challenger were analyzed as well as additional material from several important museums. Here, two new species are described and 27 had their descriptions complemented and pictures of the colonies, zooids, larvae, and spicules showed. *Didemnum* n. sp.1 has colony surface black with common cloacal apertures white, testis undivided surrounded by 7 to 9 coils of the sperm duct, larvae with 0.5 to 0.6 mm of trunk and six rounded pairs of ectodermic ampullae. *Didemnum* n. sp.2 has pigmented tunic, stellate spicules, testis undivided, surrounded by 5 to 6 coils of the sperm duct, larva pigmented with 1.2-1.4 mm of trunk and four pairs of ectodermal ampullae.

KEY WORDS. Expeditions, Tunicata, Taxonomy

RESUMO. *Didemnum* Savigny, 1816 é o gênero mais diverso em Didemnidae e o segundo dentro de Ascidiacea. Ele contém 237 espécies válidas, bem representadas em águas australianas. Muitos espécimes coletados em importantes expedições oceanográficas como Siboga e Challenger foram analisadas, assim como espécimes adicionais que estão depositados em vários museus importantes. Aqui, duas novas espécies são descritas e outras 25 tiveram sua descrição complementada. *Didemnum* n. sp.1 tem a superfície da colônia negra com as aberturas cloacais brancas, testículo único rodeado por 7 a 9 voltas do espermiduto, larva medindo 0.5-0.6 mm de comprimento de tronco e seis pares de ampolas ectodérmicas arredondadas. *Didemnum* n. sp.2 tem a túnica pigmentada, espículas estreladas, testículo único rodeado por 5 a 6 voltas do espermiduto, larva medindo 1.2-1.4 mm de comprimento de tronco e seis pares de ampolas ectodérmicas arredondadas.

PALAVRAS-CHAVE. Expedições, Tunicata, Taxonomia

Didemnum Savigny, 1816 is the most diverse genus of Didemnidae and the second one in the whole Class Ascidiacea. Currently, it has 237 valid species (Shenkar *et al.* 2018), most studied represented in Australian waters (Kott 2001). Savigny (1816) diagnosed *Didemnum* to accommodate two species, *Didemnum candidum* Savigny, 1816 and *Didemnum viscosum* Savigny, 1816 (>*Diplosoma viscosum*). In Savigny's description, he just addressed some colony's external appearance, systems without central cavities, with both apertures superior, mentioning just the female gonad. Testis and sperm duct were not described nor the number of the rows of stigmata. In 1841, Milne Edwards recognized the genera diagnosed by Savigny (1816) and proposed another genus called *Leptoclinum*, including many gelatinous didemnids, with common cloacal systems. In 1886, Herdman complemented the diagnosis of *Didemnum*, retaining the classification based on Della Valle's description (Della Valle, 1811). He discussed the close relationship between *Didemnum* and *Tetradidemnum*, but he did not retain the two subgenera: *Tetradidemnum* and *Trididemnum* for *Didemnum*. He did not consider the number of rows of stigmata as an important characteristic to define genus and used the thickness of the colony in combination with the colony consistency to classify species. Van Name (1902) had a special attention towards *Didemnum* species and recognized some classification that involved *Leptoclinum*. Before Sluiter (1909), the authors mentioned above did not have a clear view of the diagnosis of genera within Didemnidae. Sluiter (1909) separated *Trididemnum* and *Didemnum* in two different genera and many species with four stigmata rows identified as *Leptoclinum* were synonymized with *Didemnum* while others with three stigmata rows were synonymized with *Trididemnum*. After then, *Didemnum* was characterized by having zooids divided into two regions, thorax and abdomen, separated by a very narrow neck. Zooids rarely exceed 1 mm in length, have four rows of stigmata, a large atrial opening, sometimes a small atrial languet, spiral sperm duct with one or two testicular follicles and calcareous spicules in part or in the whole tunic (Monniot 1995; Kott 2001). The larva, usually, has four pairs of ectodermic ampullae and is not gemmiparous, however, some species can have several ectodermic ampullae and two or, rarely, three embryos.

Many collections of marine organisms, specially Tunicata collections, from several museums have never had been a special curator also specialist in the group, except for the collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle which curator for several years have been important ascidian taxonomists, Claude and Françoise Monniot. The

Tunicata Collection of the Zoological Museum at Amsterdam was revised by Spoel (1968) and posteriorly by (Kott 1981). Nowadays, that collection is a part of Naturalis Biodiversity Center together with Rijksmuseum van Natuurlijke Histoire and contain types collected by Siboga Expedition and by some important researchers like R. Hartmeyer, W.A. Herdman, W. Michaelsen, W.E. Ritter and M.P.A. Trausted. The Tunicata Collection of United States National Museum was analyzed by Tokioka (1967) in which he described many species from Pacific regions and Atlantic Ocean. The collection of Natural History Museum (London) contains types collected by Challenger Expedition and Siboga Expedition. In this collection, no one has never have reviewed the material of *Didemnum* (Lower, M., pers. communication). This study intended to reanalyze and describe species of *Didemnum* housed in several museums around the world as a complement of incomplete description present in the literature.

MATERIAL AND METHODS

Abbreviations

AMNH American Museum Natural History, New York, USA

DZUP Ascidiacea Collection of the Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Brazil

LIPY Tunicata Collection of Laboratório de Invertebrados Marinhos Paulo Young, Universidade Federal da Paraíba, Brazil

NHM Natural History Museum, London

SMF Senckenberg Museum Frankfurt am Main, Germany

SMNH Steinhardt Museum of Natural History and National Research Center, Tel-Aviv University, Israel

UF Florida Museum Natural History, University of Florida, EUA

USNM

ZMA Zoölogisch Museum of Amsterdam, part of Naturalis Biodiversity Center, The Netherlands

During the present study, 84 specimens were analyzed (Table 1) among which type specimens and other additional material stored in the museums AMNH, DZUP, LIPY, NHM, RMNH, SMNH, SMF, UF and ZMA. Many samples were originated from important oceanographic expeditions such as the Siboga (Sluiter 1909) and Challenger (Herdman 1886). Samples from the Atlantic Ocean, Mediterranean Sea, Red Sea and Pacific Ocean were examined. Most of them were photographed and plates were made using Adobe Photoshop CS6 and CorelDRAW X6. Zooids and larva were measured following a pattern which can be observed in figure 1. They were identified and morphologically compared to the original description of each species when it was possible and with other descriptions available in the published literature.

Dissection. Transverse sections of various thicknesses were made in the colonies using a razor blade and the zooids and larvae were removed with microsurgery instruments under a Stereomicroscope model Zeiss Discovery.V8 MS-163. After, they were stained with Harris hematoxylin dye and then they were also observed under a light microscope. For all those colonies with a high density of spicules, Hydrochloric acid (HCl) was used to decalcify the colony and make the dissection easier.

Permanent slides. The zooids and/or larvae were dehydrated in four different grades of ethanol (70%, 80%, 90%, and butyl-ethanol) for one minute in each stage. Then they were mounted on a slide with resin Euparal or Durcuplan (Sigma), covered with a coverslip, and were placed on a slide dryer for approximately two months for drying. The structures of the zooids and larvae were measured and photographed in a DIC microscopy model Zeiss Scope coupled to a camera model A1 AxioCam MRc.

Scanning electron microscope (SEM). The calcareous spicules of the species were examined under a JEOL JSM-6480LV scanning electron microscope with a Quick Carbon Coater SC-701C in Naturalis Biodiversity Center, Leiden under a JEOL JSM-6360-LV scanning electron microscope with a Gold Coater in Centro de Microscopia Eletrônica (CME) of Universidade Federal do Paraná.

A small sample of each colony (~25 mm²) was incinerated individually to remove the tissue and was put in a melting pot containing bleach for 5 min to remove remaining tissues. Bleach was carefully removed with a pipette and the spicules washed for four or five times with demineralized water to remove the maximum of dirt from the substrate or fecal pellets present in the tunic. Then, a drop of spicules was poured on a

small piece of copper tape fixed to the stub SEM and the remaining material was stored in an Eppendorf tube containing 70% ethanol.

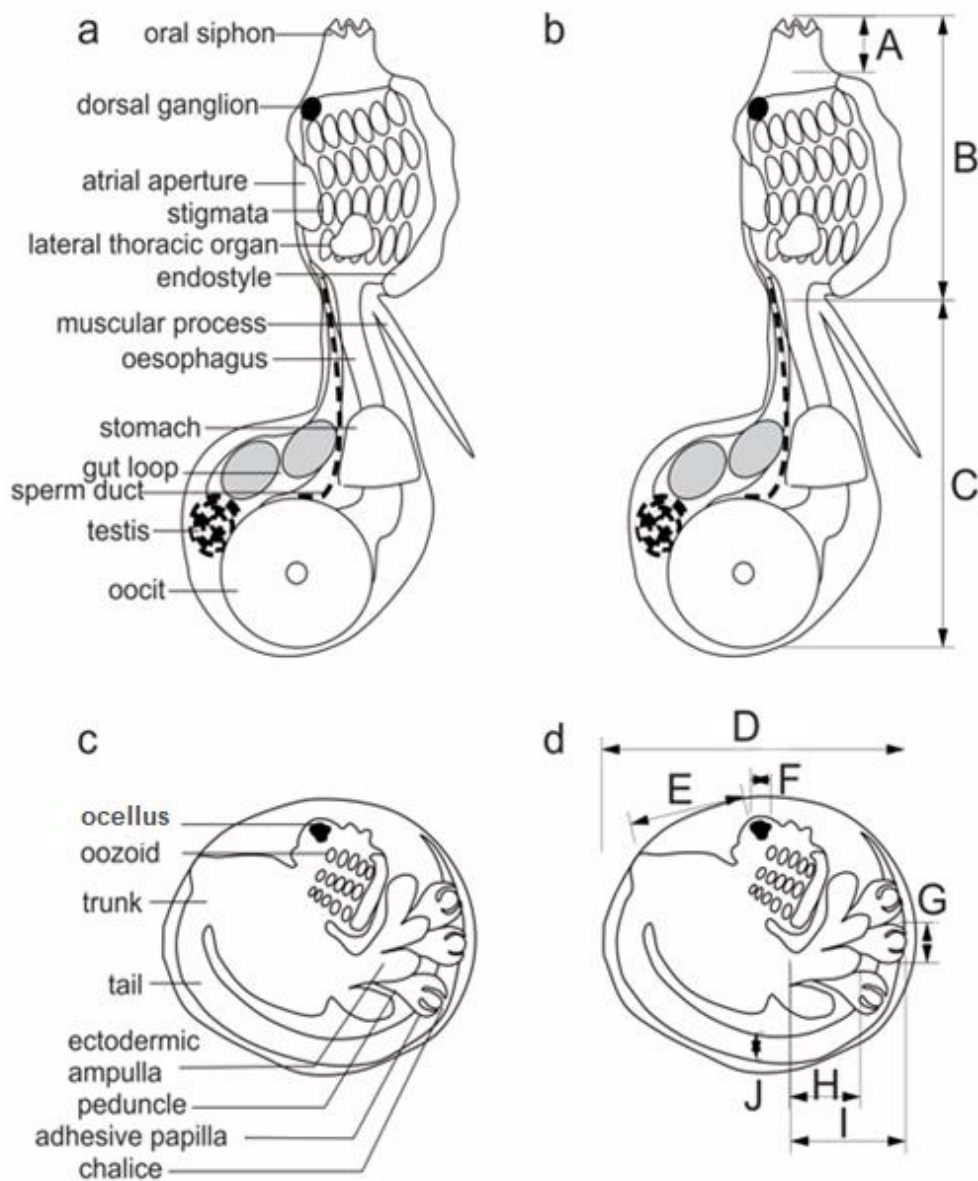


Figure 1. *Didemnum* morphology. Zooid (a-b) and larva (c-d) removed from the tunic. **a, c:** Zooid and larva characters. **b, d:** Zooid and larval measurement. **A,** Length of the oral siphon. **B,** Length of the thorax. **C,** Length of the abdomen. **D,** Length of the larva without tail. **E,** Distance between the ocellus and the anterior region of the tail. **F,** Length of the statocyte. **G,** Diameter of the chalice. **H,** Length of the ectodermal ampullae. It corresponds the distance between the edge of the ampullae and the region where each one is separated. **I,** Length of the adhesive papillae. The distance between the edge of the chalice and the base of the ampullae. **J,** Width of the tail at the level of the sensorial vesicle.

TAXONOMY

Order APLOUSOBRANCHIA Lahille, 1886

Family DIDEMNIDAE Giard, 1872

Genus *Didemnum* Savigny, 1816

Didemnum albidum (Verrill, 1871)

Leptoclinum albidum Verrill, 1871: Verrill, 1871: 446.

Tetradidemnum albidum: Van Name, 1910: 378, fig.13-15, pl.35, fig.2, pl.39, fig.13.

Didemnum albidum: Hartmeyer, 1909: 1449 (in part). Tokioka, 1963: 133; Marks, 1996: 361 and synonymies, fig.3a-j, 4a, 5a-b (6-8).

Examined material. AMNH 108 one colony, off laboratory, Brandy Cove St. Andrews, New Brunswick, Canada, 08/08/1913, *leg.* Biologicall Station Boat ‘Prince’. AMNH 384 one colony, Peowhetis Point, Greenland, 11/10/1917, *leg.* Crokerland Expedition. AMNH 736 one colony, Eastport, Maine, United States of America, 15/06/1922, *leg.* U.S.F.C. AMNH 1125 one colony, Siberia (54°48’45” N, 139°27’0” E), 14 to 20 m depth, 05/08/1911, *leg.* Soidaton, V.

Geographical distribution. Maine (Verrill, 1871), New England (Van Name 1910), Faeroes (Hartmeyer 1912), Norway (Hartmeyer 1922; Marks 1996), Scotland (Millar 1988b), Japan (Nishikawa 1990; Tokioka 1963).

Remarks. *Didemnum albidum* is considered a circumpolar species with extreme variation in colony color as well as variable spicule morphology (Marks 1996). The diagnosis includes sperm duct with 4 to 8 turns and testis with 1 or 2 lobes. All the specimens analyzed have all the characteristics according to Millar (1988). Spicules are distributed mainly on the colony surface. The oral siphon is large and the lobes of the oral siphon too. The atrial languet is long and pointed. The lateral thoracic organ is circular, not protruding, located at the level of the 3rd row of stigmata. The testis is divided in two lobes, surrounded by four coils of the sperm duct. Larvae were not observed.

Didemnum albopunctatum Sluiter, 1909

(Fig. 2)

Didemnum albopunctatum Sluiter, 1909: 58 (part, stat. 231), pl. 6, fig. 8. Kott, 1981: 162, fig. 16A-B, 20; 2001: 148 and synonymy, figs. 69, 165H, pl. 7A-D; 2004a: 747; 2004b: 2488, fig. 18D; 2005: 61, fig. 8E; 2007: 1176.

Examined material. ZMA TU 433.2 one colony, lectotype Sluiter 1909), Ambon anchorage, Indonesia. Siboga Expedition, Stat. 231, 14 m depth, 18/11/1899. UF 2021 one colony, Philippines, Oriental Mindoro Province, Puerto Galera between the boulders and Coral Cove dive sites, sandy with isolated coral heads (13°30'54.4" N, 120°59'10.7" E), VIP15-GP-0556, GAL-085, 10 m depth, 14/04/2015. *leg.* Paulay, G. UF 2038 one colony, Philippines, Oriental Mindoro Province Mindoro, Puerto Galera (13°31'22.8"N, 120°56'50.3"E), W corner of San Antonio Island (=Medio Island), 17-23 m depth, VIP15-GP-0861, GAL-092, 17/04/2015, *leg.* Paulay, G.

Geographical distribution. Type locality: Indonesia (Sluiter, 1909). Further records: Philippines (this study), Palau Islands (Monniot & Monniot 1996), Australia (Kott 2001), Solomon (Kott 2005), New Caledonia (Monniot 1995), Fiji (Kott 1981).

Remarks. This species was described by Sluiter (1909) from Indonesia and I have examined all the specimens studied by him. In the lectotype (ZMA TU 433.2), gonads and larvae were not found, however the observed characteristics corresponded with Kott's description (Kott 1981) for *D. albopunctatum* Sluiter, 1909. Later, she reported *D. albopunctatum* to Queensland with the first and only description of the larva of this species. She described the larvae with two adhesive papillae and four pairs of ectodermal ampullae but in her figure it looks like it has six pairs of ectodermal ampullae (Kott 2001). Kott also synonymized *D. biglutinum* Monniot, 1995 from New Caledonia with *D. albopunctatum* Sluiter, 1909, however Monniot (2010) did not accept this procedure if based only on spicules shape, as argued by Kott (2001). Thus, I also have analyzed some samples from Philippines and they have all the characteristics described by Kott (2001).

The colony is pigmented, the lateral thoracic organ is circular, and larvae have about 0.4 mm of trunk, two papillae adhesive and four elongated ectodermal ampullae. Based in all those shared characteristics, it is possible that both *D. albopunctatum* and *D. biglutinum* can be the same species.

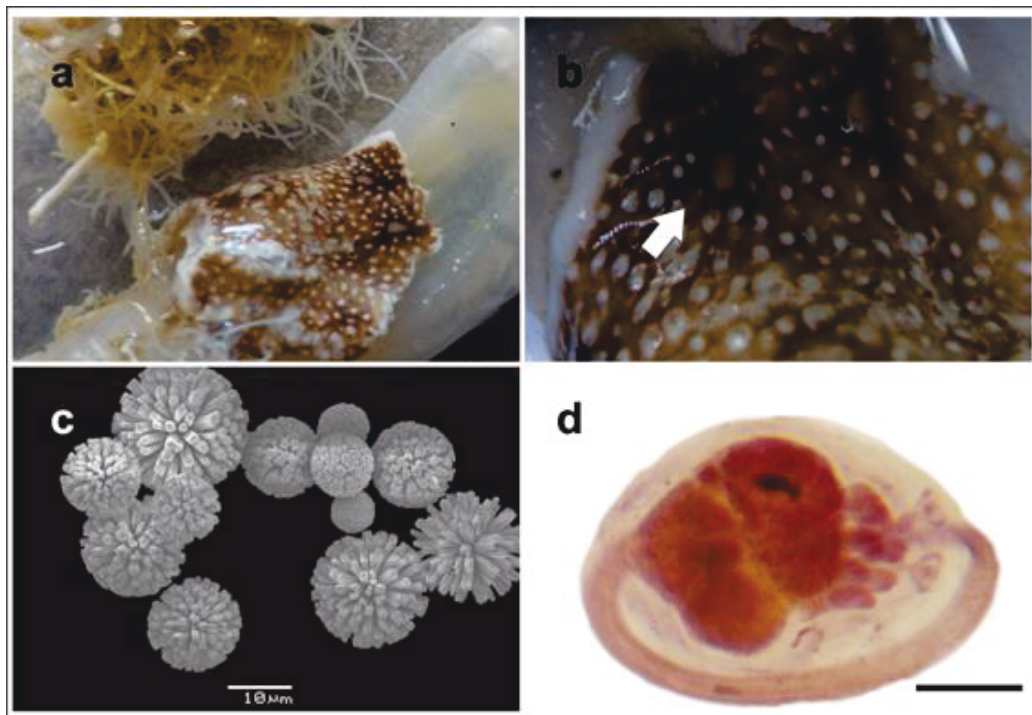


Figure 2. *Didemnum albopunctatum* Sluiter, 1909. a, preserved colony. b, detail of the colony surface. Arrow indicates the cloacal aperture. c, spicules. d, larva stained with Hemalun. Scale bar in d = 0.1 mm.

Didemnum calliginosum Monniot, 1984

Didemnum calliginosum Monniot, 1984: 891, fig. 2a-c, pl. 1c.

Examined material. DZUP DID-410 one colony, Hospital Point, Bocas del Toro, Panamá (9°20'04" S, 82°13'10" W), slide DID 4.24, 4 m depth, 20/08/2006, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-728 one colony, Marina Bocas, Bocas del Toro, Panamá (9°20'8" N, 82°14'48" W), slide DID 4.25, 21/06/2014, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-400 one colony,

Marina Bocas, Bocas del Toro, Panamá (9°20'8" N, 82°14'48" W), slide DID 4.26, 21/06/2014, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-401 one colony, Crawl Key, Bocas del Toro, Panamá (9°20'13" N, 82°08'10" W), 23/06/2014, *leg.* Rocha, R.M.

Geographical distribution. Type locality: Guadeloupe (Monniot 1984). Further records: Panamá (this study).

Remarks. *Didemnum calliginosum* was reported just one time when it was described by Monniot (1984) to Antilles, and now it was found in Bocas del Toro in Panamá. In both localities, this species was collected in boat marina between 2-4 m depth. This species is characterized by dark pigmentation in the tunic, low density of spicules, presence of a gland in the abdomen and larva measuring 0.6 mm of trunk with four pairs of ectodermal ampullae.

Didemnum candidum Savigny, 1816

(Fig. 3 a-c)

Leptoclinum candidum Savigny, 1816: 14, 194, pl. A, fig. 3; pl. 20, fig. 1.

Leptoclinides africanus Michaelsen, 1914: 78

Leptoclinum annectens Herdman, 1886: 280, pl.24, fig.14; pl.28, fig.5-9.

Leptoclinum cretaceum Sluiter, 1898: 36, pl.1, fig.11, pl.5, fig.7-10.

Leptoclinum niveum Nott, 1892: 308, pl. 24.

Didemnum fusiferum Van Name, 1921: 331, fig.26.

Didemnum novaeseelandiae Hartmeyer, 1909-11: 1450.

Didemnum candidum: Lafargue, 1974: 340, fig.1-3 and synonymies.

Examined material. ZMA TU 436 one colony, Split, Dalmatia, Croatia, 04/06/1961.

Geographical distribution. Type locality: Gulf of Suez, Red Sea (Hartmeyer 1915; Lafargue 1974; Michaelsen 1919, 1920; Savigny 1816), Arabian Gulf (Monniot & Monniot 1997a), Mozambique (Sluiter 1898), Mauritius, Malagasy (Michaelsen 1920), Tanzania (Monniot & Monniot 1997b), Western Pacific (Tokioka 1967), Australia (Hastings 1931).

Remarks. *Didemnum candidum* was described by Sluiter (1909) from Gulf of Suez. Many authors have been reported *D. candidum* for many regions around the world. Therefore, it was considered a species with wide range of character variation. Lafargue (1974) described a neotype of *D. candidum* based in a sample from Gulf of Aqaba. In her paper, she clarified many misidentifications that involved this species and its geographical distribution. According to Kott (2001), this species is very common in Australian waters. She reported *D. candidum* to Australia and described the larva with variation of size, although this is not common in *Didemnum*. In her specimens, the larvae vary between 0.3 to 0.75 mm of trunk and the tail winds about halfway of the trunk. In our sample, the larva measured 0.4 mm of trunk and tail winds about three-quarters of the way around the trunk as described by Lafargue (1974). The spicules of Kott (2001) specimens have long slightly club-shaped or cylindrical rod-like rays with rounded tip. Our specimen has conical rays. So, I believe that *D. candidum* reported by Kott to Australia represents another species.

Didemnum carnulentum Ritter & Forsyth, 1917

(Fig. 3 d-f)

Didemnum carnulentum lacteolum Ritter & Forsyth, 1917: 471, pl.40, fig.23, pl.44, fig.60.

Didemnum carnulentum Ritter & Forsyth, 1917: 470, pl.39, fig.11, pl.44, pl.57-59; Van Name, 1945: 93, fig. 40; Millar, 1988: 230, fig. 3.

Examined material. AMNH 1777 one colony, Gulf of California. USNM 10618 five colonies, Salinas Bay, Carmen Island, Gulf of California, North Pacific Ocean (26° N, 111 W), 03/04/1911.

Geographical distribution. California (Ritter and Forsyth 1917; Van Name 1945), Oregon to Panama (Millar 1988a; Van Name 1945).

Remarks. Ritter & Forsyth (1917) did not describe the larvae of this species, but the larva for samples studied here have the same characteristic of those ones described by Millar (1988). Neither of those authors commented on the presence of papillae on the colony surface, associated to oral siphons. The colonies grow involving the substrate and forming lobes. Because of this, it was not possible to define exactly the thickness of the colony. The colony surface has visible cloacal systems that give it a reticulated appearance with papillae. The spicules are evenly distributed throughout the colony and in high density, thus colony is brittle and has a rough appearance. The larvae were found at the colony surface and measured about 0.4 mm of trunk. A tail winds completely around the trunk. There were three adhesive papillae with long and thin peduncle. There were four elongated ectodermal ampullae on each side.

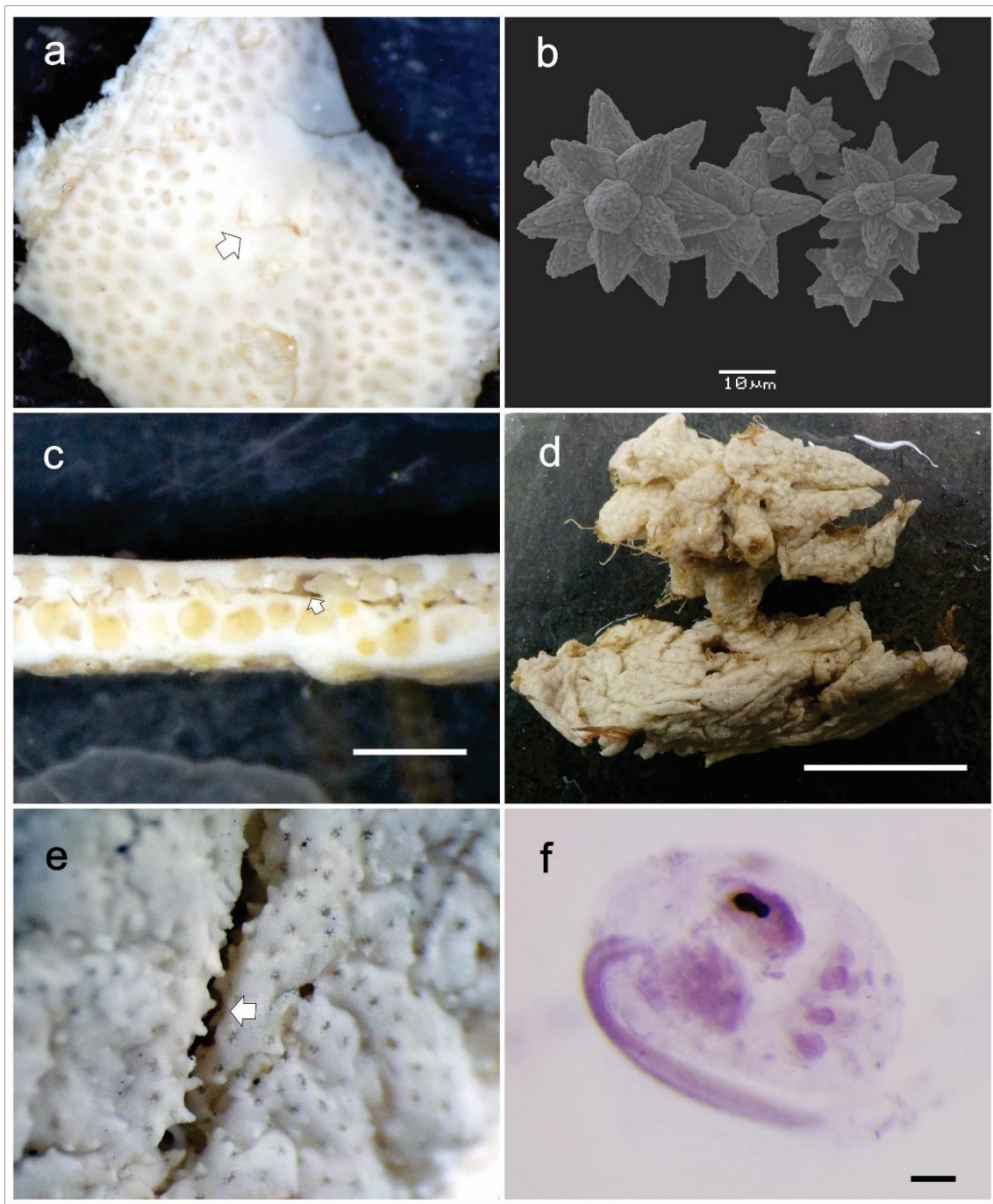


Figure 3. *Didemnum candidum* Savigny, 1816. a, preserved colony. Arrow indicates the common cloacal aperture. b, spicules. c, cross section of the colony. Arrow indicates the cloacal cavity. *Didemnum carnulentum* Ritter & Forsyth, 1917. d, preserved colony. e, detail of the colony surface. Arrow indicates the papillae present on it. f, stained larva. Scales bar: c = 1 mm. d = 1 cm. f = 0.1 mm.

Didemnum chartaceum Sluiter, 1909

(Fig. 4)

Didemnum chartaceum Sluiter, 1909: 57; Hastings, 1931: 97, fig. 14A-B; Kott, 1981: 163, fig. 16c, 21; 1998: 81; 2001: 160, figs. 76, 166G, pl. 7G.

Examined material. ZMA TU 437 three colonies (Syntype), Bay of Dadjo, West coast of Flores, Indonesia. Siboga Expedition. Stat. 50, 16/04/1899. NMH 1932.4.27.1 one slide (part of Syntype), Indonesia, Siboga Expedition, Sta. 50, 16/04/1899.

Geographical distribution. Type locality: Indonesia (Sluiter 1909). Further records: Fiji (Kott 1981), Australia (Hastings 1931; Kott 2001).

Characterization. Preserved colonies have cream color, measure 3-6.5 cm in diameter and are 2 mm thick. They look like a sponge without spicules. Common cloacal apertures are small with seven or eight short lobes. The cloacal cavity is thoracic. The tunic is translucent, smooth and breakable. The zooids can be seen on the colony surface. Spicules are abundant on the colony surface, low abundance in the middle of the colony and almost absent in the basal layer. There are three kinds of spicules. They are globular with short conical rays, globular with cylindrical rays and globular without defined rays. For the first two kinds, they have about 14-16 pointed rays in optical transverse section. The size of the spicules varies between 20 to 36 μm in diameter.

Zooids do not exceed 1 mm long and they are easy to extract from the tunic. The oral siphon is very short, 0.1 mm in length, with 6 short triangular lobes. The atrial aperture is wide, exposing half of the pharynx. The atrial languet is long, large and bifurcated, sometimes it is removed during the dissection. The lateral thoracic organs have a circular shape, protruding, located at the level of the 2nd row of stigmata. The muscular process is shorter than the thorax, projects in the anterior region of the esophageal peduncle. The stomach smooth and large. The oesophageal peduncle is short and curved. The secondary gut loop doesn't overlay the stomach. The testis is undivided, surrounded by 8 coils of the sperm duct. Larvae do not found.

Remarks. In all the colonies analyzed (syntypes), larvae are not present. Sluiter (1909) described it from Indonesia and after Hastings (1931) reported it to Australia. Her specimen has spicules different of *D. chartaceum* type. The zooids have seven stigmata in each half of the row and have huge stoloniferous vessels. The last characteristic was not observed to me in the type material and it was not reported by Kott (2001) too. It is possible that Hastings specimen do not be *D. chartaceum*. Kott specimens showed all the characteristic of the type specimen, except for the size of the spicules. Her specimens have spicules with 75 μm in diameter and about 30 rays in optical transverse section, while the type has spicules with 20 to 36 μm in diameter and 16 rays in optical transverse section.

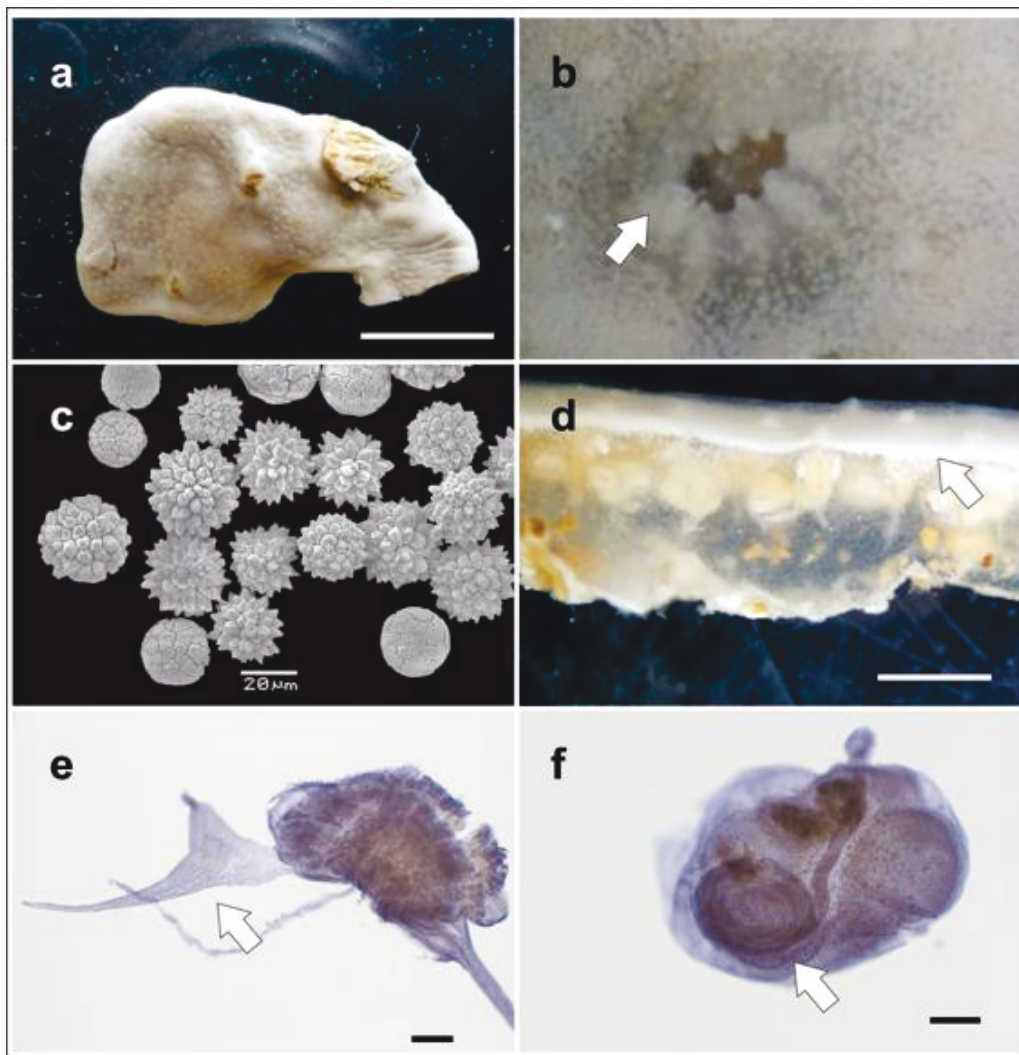


Figure 4. *Didemnum chartaceum* Sluiter, 1909. a, preserved colony. b, colony surface. Arrow indicates the details of the cloacal aperture. c, spicules. d, cross section of the colony. Arrows indicates the cloacal cavity. e, thorax (arrow indicating the atrial languet). f, abdomen (arrow indicating the testis). Scales bar: a = 1 cm. d-e = 0.1 mm.

Didemnum cineraceum (Sluiter, 1898)

Leptoclinum cineraceum Sluiter, 1898: 30, pl.2, fig.41, pl.3, fig.48.

Didemnum cineraceum: Van Name 1921: 484; Monniot, 1983: 21; 1995: 303, fig.3, pl.1c, 3f. Oliveira-Filho, 2010: 45; Monniot and Monniot, 1994: 72.

Examined material. DZUP DID-402 one colony, Town Docks, Bocas del Toro, Panamá (9°20'13" N, 82°14'25" W), slide DID-4.23, 06/08/2008, *leg.* Rocha, R.M. ZMA TU 157 one colony, St. Joris Baai, Curaçao (12°07'35.8" N, 68°48'34" W), 30/11/1958, *leg.* Stock, J.H. DZUP DID-346 one colony, Marina Mercado Modelo, Salvador, Bahia, Brazil (12°58'21" S, 38°30'56" W), 02/03/2012, *leg.* Neves, I.M. DZUP DID-190 one colony, Quebramar Sul, Salvador, Bahia, Brazil (12°58'22" S, 38°31'09" W), 9-11 m depth, 07/08/1999, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-149 one colony, Portinho de Itaparica, Salvador, Brazil (12°53'30" S, 38°41'02" W), 5 m depth, 04/08/1999, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-90 one colony, Porto Petrobrás, São Sebastião, São Paulo, Brazil (23°48'07" S, 45°23'27" W), slide DID 1.78, 30/01/1996, *leg.* Rocha, R.M.

Geographical distribution. Type locality: Jamaica (Sluiter, 1898; Goodbody 2003). Further records: Guadeloupe (Monniot 1983), Venezuela (Rocha *et al.* 2010), Brazil - Ceará, Bahia, São Paulo (Oliveira-Filho 2010; Rocha & Bonnet 2009), Sierra Leoa (Monniot & Monniot 1994), New Caledonie (Monniot 1995).

Remarks. *Didemnum cineraceum* (Sluiter, 1898) is characterized to have gemmiparous larva with 1-1.5 mm of trunk and between 6 to 11 elongated ectodermic ampullae. This species has a combination of characters exclusive to diagnostic it even with the absence of reproductive structures in zooids, as shape of lateral thoracic organ and number of testis lobes.

Didemnum dealbatum Sluiter, 1909

(Fig. 5)

Didemnum dealbatum Sluiter, 1909: 55.

Examined material. ZMA TU 441.1 one colony (syntype), Anchorage off Pulu Jedan, East coast of Aru-islands (Pearl-banks), Indonesia, Siboga Expedition, Stat. 273, 13 m depth, 23/12/1899.

Geographical distribution. Type locality: Indonesia (Sluiter 1909).

Characterization. The colony has white colour in preserved material. It grows above sponges, polychaete tubes and algae, involving them in some region. It measures about 7 cm in diameter and 2-4 mm in thickness. The colony surface is smooth and has many cloacal apertures. Some of them are very close together. They are large and have no lobes. The cloacal cavities are thoracic and abdominal. The tunic is cartilaginous and translucent above the spicules layer. There is a thin layer of spicules on the colony surface that is easy to remove it. Below that, the density of spicules is low and looks like they are not present on the basal layer of the colony. The spicules are stellate, measuring about 20 µm in diameter, with 10 conical rays in optical transverse section.

Zooids are about 1.2-1.5 mm long. The thorax has, on each side, five muscle bands with two fibers each one. The oral siphon has six long triangular lobes and measures about 0.2 mm in length. The atrial aperture is wide, exposing almost all the pharynx. The lateral thoracic organs have circular shaped and protruding, localized in the posterior half of the thorax above the third and fourth stigmata row. The muscular process is shorter than the thorax, projects in the middle of the oesophageal peduncle. The oesophageal peduncle is long. The abdomen is positioned vertically in relation to the thorax. Secondary gut loop overlays the stomach. The oocyte is yellowish, measuring 0.4 mm in diameter. The testis is not present or visualized.

The larvae are present in the basal layer of the colony, below of the abdomen. However, many of them were found below the spicules layer in the superior region of the colony. They are large, spherical and measure between 0.7 to 0.8 mm of trunk. The small larvae can be circular shaped. A tail winds about three-quarters of the way around the trunk. Three adhesive papillae are present and are close together. Peduncle of adhesive papillae is long and thin. Eight elongate and thin lateral ampullae are on each side of the larva. Sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the mid-dorsal region of the larval trunk. Larvae not gemmiparous.

Remarks. Sluiter (1909) did a brief description of *D. dealbatum* Sluiter, 1909, but he did not mention the larva. Kott (2001) re-examined the sample ZMA TU 441.1. She just mentioned some characteristics of the colony. Here, it is the first complete description of *D. dealbatum* with larva after Sluiter (1909).

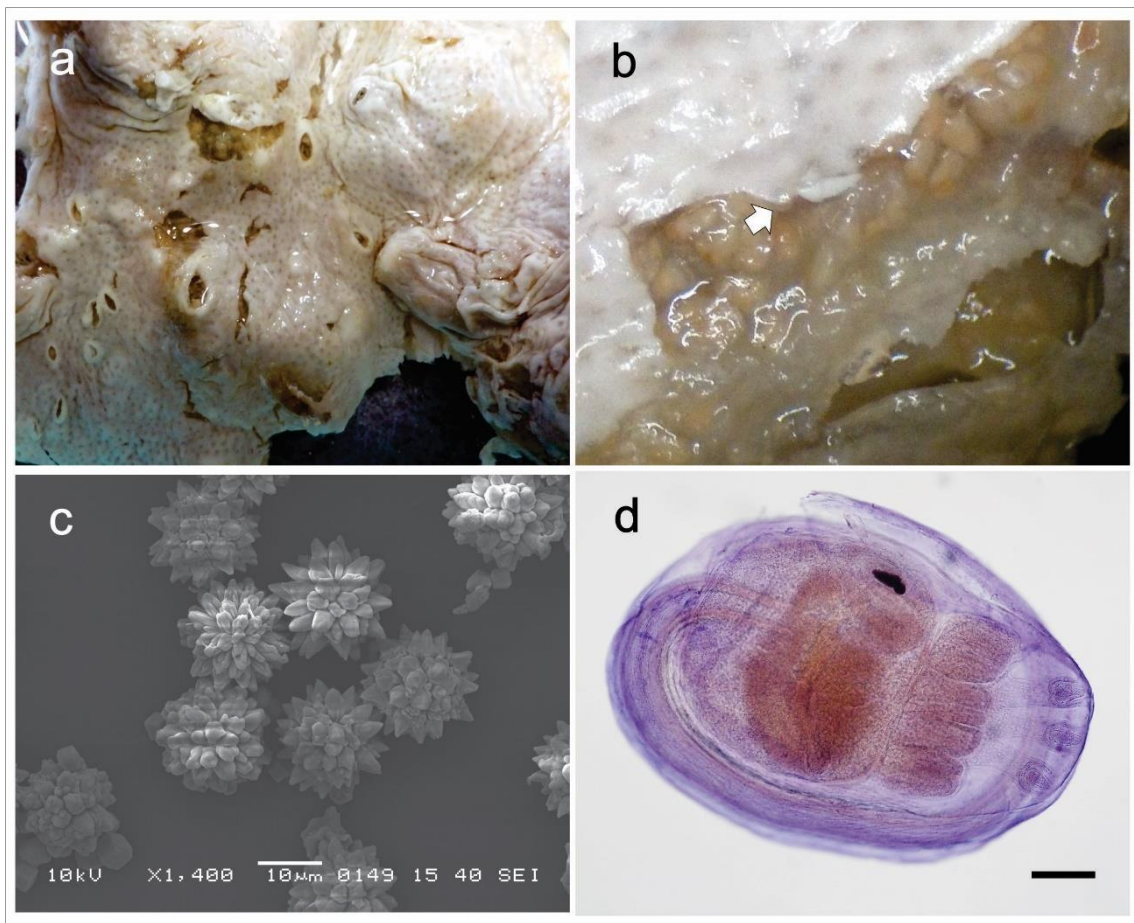


Figure 5. *Didemnum dealbatum* (Sluiter, 1909). a, preserved colony. b, cross section of the colony. Arrow indicates the cloacal cavity. c, spicules. d, stained larva. Scale bar: 0.1 mm.

Didemnum duplicatum Monniot, 1983

Didemnum duplicatum Monniot, 1983: 23, fig. 8, pl. 1e; Monniot, 2016: 206, fig. 4A.

Examined material. DZUP Did-773 one colony, Wilmington, North Caroline, United States of America, 24/07/2014, *leg.* Lambert, G. USNM 1092833 one colony, Manatee Lagoon, Pelican Cays, Belize (16°38'60" N, 88°12'00" W), BZ-PCY-163, 27/04/1993, *leg.* Goodbody, I. ZMA TU 1812 one colony, Entrada da Baía, Piscadera bay, Curaçao (12°07'23.6" N, 68°58'11.1" W), 0-0.5 m depth, stat. n° 1464, substrate *Rhizophora*, 28/11/1963, *leg.* RUU. ZMA TU 1813 one colony, South interior bay, Piscadera bay, Curaçao (12°07'33.5" N, 68°58'09.9" W), 0-1 m depth, stat. n° 1469, substrate *Rhizophora*, 18/12/1963, *leg.* RUU. ZMA TU 18 one colony, Isla Maguey, Puerto Rico south coast, on mangrove roots, 05/02/1963, *leg.* Stock, J.H. DZUP DID-722 one colony, Baia da Traição, Paraíba, Brazil (6°41'15" S, 34°55'50" W), 0-0.5 m depth, slide DID-4.07, 12/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. UFPB TUN-250 one colony, Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brazil (6°45'46" S, 34°55'07" W), 0-0.5 m depth, 10/01/2009, *leg.* Projeto Biota Paraíba. DZUP DID-758 one colony, Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brazil (6°45'46" S, 34°55'07" W), 0-0.5 m depth, slide DID 4.28, 14/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-763 one colony, Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brazil (6°45'46" S, 34°55'07" W), 0-0.5 m depth, slide DID 4.29, 14/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-764 one colony, Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brazil (6°57'52" S, 34°50'34" W), 0-0.5 m depth, 25/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-765 one colony, Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brazil (6°57'52" S, 34°50'34" W), 0-0.5 m depth, 25/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-766 one colony, Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brazil (6°57'52" S, 34°50'34" W), 0-0.5 m depth, 25/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-724 one colony, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brazil (7°08'50" S, 34°47'51" W), 0-0.5 m depth, slide DID 4.10, 28/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-723 one colony, Carapibus, Conde, Paraíba, Brazil (7°16'19" S, 34°48'07" W), 0-0.5 m depth, slides DID 4.08 and DID 4.09, 26/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-725 one colony, Coqueirinho, Conde, Paraíba, Brazil (7°19'14" S, 34°47'40" W), 0-0.5 m depth, slide DID 4.11, 27/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-767 one colony, Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brazil (20°40'31.9" S, 40°22'1.03" W), 27/03/2017, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-768 one

colony, Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brazil (20°40'31.9" S, 40°22'1.03" W), 27/03/2017, *leg.* Rocha, R.M.

Geographical distribution. Type locality: Guadeloupe (Monniot, 1983). Further records: Panamá (Rocha *et al.* 2005), Belize (Goodbody 2000), Jamaica (Goodbody 2003), Venezuela (Rocha *et al.* 2010), French Guiana (Monniot 2016), Brazil (Gama *et al.* 2006).

Remarks. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 was described to Guadeloupe by Monniot (1983) and posteriorly to other islands in Caribbean sea (Goodbody 1984a; b, 2000; Rocha *et al.* 2010) and Texas (Lambert *et al.* 2005). In Brazil, this species was reported at the first time by Gama *et al.* (2006) in Paraíba state. This species is similar in shape of spicules and number of testis lobes with *D. galacteum* Lotufo & Dias, 2007. When the lateral thoracic organ cannot be visualized, or the larva is not present, the identity of both species *D. duplicatum* and *D. galacteum* can be confused. They also occur in sympatry in some localities (Monniot 2016). The characteristics that define this species is a Z-shaped lateral thoracic organ, testis with two lobes and larva with 8 pairs of ectodermic ampullae.

Didemnum galacteum Lotufo & Dias, 2007

Didemnum galacteum Lotufo & Dias, 2007: 138, figs 1-3; Monniot, 2016: 207.

Examined material. DZUP DID-756 one colony, Pirambúzios, Parnamirim, Rio Grande do Norte (05°52'34" S, 35°09'06" W), 2 m depth, 28/08/2015, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-759 one colony, Barra de Camaratuba, Mataraca, Paraíba, Brazil (6°36'12" S, 34°57'51" W), 0-0.5 m depth, 13/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-726 one colony, Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brazil (6°46'11" S, 34°55'10" W), 0-0.5 m depth, slides DID 4.14 and DID 4.15, 14/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-

771 one colony, Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brazil (6°57'52" S, 34°50'34" W), 0-0.5 m depth, 25/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-761 one colony, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brazil (7°08'50" S, 34°47'51" W), 0-0.5 m depth, slide DID 4.27, 28/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-727 one colony, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brazil (7°08'50" S, 34°47'51" W), 0-0.5 m depth, 28/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-761 one colony, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brazil (7°08'50" S, 34°47'51" W), 0-0.5 m depth, 28/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-772 one colony, Ponta de Pedras, Goiana, Pernambuco, Brazil (7°36'55" S, 34°48'33" W), 0-0.5 m depth, 01/09/2015, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-762 one colony, Praia de Boa Viagem, Recife, Pernambuco, Brazil (8°07'18" S, 34°53'40" W), 0-0.5 m depth, 31/08/2015, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-769 one colony, Santa Cruz, Aracruz, Espírito Santo, Brazil (20°01'53.12" S, 40°09'29.33" W), 0-0.3 m depth, 25/01/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-770 one colony, Santa Cruz, Aracruz, Espírito Santo, Brazil (20°01'53.12" S, 40°09'29.33" W), 0-0.3 m depth, 25/01/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-721, Itapema do Norte, Santa Catarina, Brazil (26°04'12" S, 48°36'21" W), 1 colônia, 0-0.5 m, slides DID 4.12 and DID 4.13, 09/03/2017, *leg.* Rocha, R.M.

Geographical distribution. Type locality: Brasil (Lotufo and Dias 2007). Further records: French Guiana (Monniot 2016).

Remarks. *Didemnum galacteum* Lotufo, 2002 was described by Lotufo & Dias (2007) to accommodate species with two testis lobes in Brazil. The colonies have a white colour with orange zooids, sometimes. The lateral thoracic organ is circular. The testis has two lobes surrounded by 8-9 coils of the sperm duct and larva is 0.6 mm long and 4 pairs of ectodermic ampullae.

Didemnum granulatum Tokioka, 1954

(Fig. 6)

Didemnum (Didemnum) moseleyi f. *granulatum* Tokioka, 1954: 244, figs. 1-4; 1963: 133; 1967: 67, fig. 20e-f; 1970: 82, figs. 1,6.

Didemnum granulatum: Kott & Goodbody, 1980: 517, fig. 6; Kott, 1981: 167, fig. 17d, 24; 2001: 188, figs 89D-F, 171F, pl. 9E-F, Monniot C & Monniot F, 1987: 31; Monniot F & Monniot C, 2001: 267; Rocha and Monniot, 1995: 641, fig. 2a-c, pl. 1b; Rocha et al. 2005: 467, fig. 16; Rodrigues *et al.* 1998: 64, fig. 7; Monniot, 2016: 207.

Didemnum moseleyi: Eldredge, 1966: 210 (part), fig. 15; Kott, 1972: 179.

Didemnum pele: Eldredge, 1966: 197, fig. 9.

Examined material. DZUP DID-365 one colony, Barra de Camaratuba, Mataraca, Paraíba, Brazil (6°36'12" S; 34°57'51" W), 0.5 m depth, 13/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP (RJ 02) one colony, Porto Real, Marina Conceição de Jacareí, Rio de Janeiro, Brazil, 01/09/2014, *leg.* Skinner, L.F. DZUP (amostra 4) one colony, Currais, Paraná, Brazil (25°44'05" S; 48°22'15" W), 22/04/2013, *leg.* Bumbeer, J.A.

Geographical distribution. Type locality: Japan (Nishikawa 1990; Tokioka 1954a, 1963). Further records: Panama French Guiana (Monniot 2016), Brazil (Lotufo 2002; Lotufo & Silva 2006; Rocha *et al.* 2005; Rocha & Bonnet 2009; Rocha & Monniot 1995; Rocha & Nasser 1998; Rodrigues *et al.* 1998), Senegal (Monniot & Monniot 1994), Hong Kong (Kott & Goodbody 1980), Fiji (Kott 1981), Palau (Tokioka 1967), Philippines and Papua New Guinea (Monniot & Monniot 2001; Tokioka 1970), Australia (Kott 1972, 2001), Polynesia (Monniot & Monniot 1987), Hawaii (Eldredge 1966).

Remarks. *Didemnum granulatum* Tokioka, 1959 is very known in the Brazilian coast whose distribution occur since Ceará State in the Northeast to Santa Catarina, South of Brazil. In Paraíba coast, it is very common in the intertidal region as observed in Ceará and Rio Grande do Norte states but in Bahia it was found in 4 m depth (Lotufo 2002). One of difference observed between the specimen type and these colonies analyzed here is the coloration. In Paraíba, there are specimen with orange color and salmon while in Paraná, it is possible to find specimen with cream color. Tokioka (1954) described the

colony with white color. Because of its disjoint distribution, *D. granulatum* was classified as cryptic species with high distribution (Rocha & Bonnet 2009).

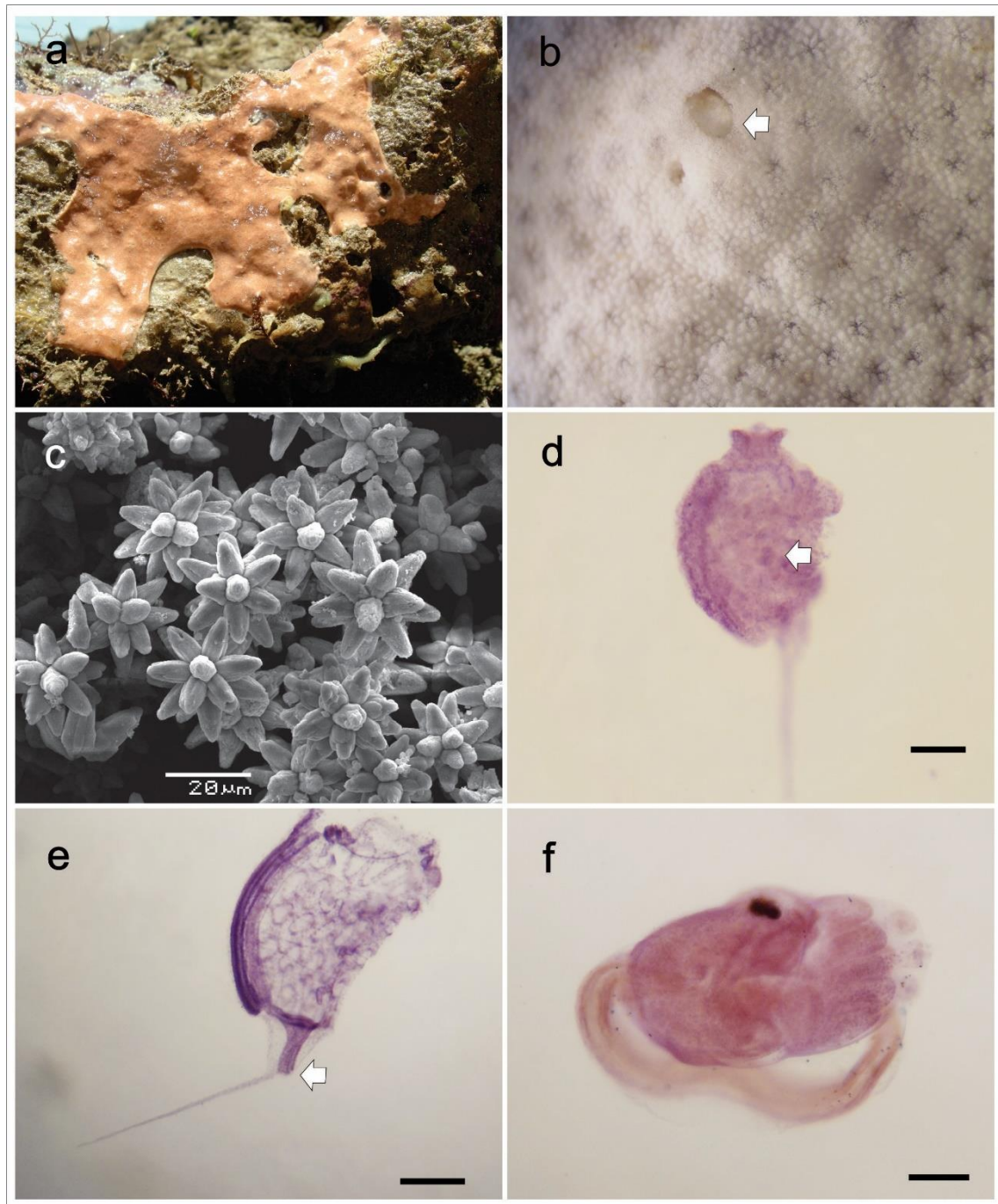


Figure 6. *Didemnum galacteum* Tokioka, 1954. a, colonies in situ in Paraíba state. b, detail of the colony surface. Arrow indicates the details of the cloacal aperture. c, spicules. d, thorax (arrow indicating the lateral thoracic organ). e, thorax (arrow indicating the muscular process projects at the posterior region of the esophageal peduncle). f, larva. Scales bar: 0.1 mm.

Didemnum jedanense Sluiter, 1909

(Fig. 7)

Didemnum jedanensis Sluiter, 1909: 58 (part); Hastings, 1931: 99; Kott, 1972: 46.

Didemnum jedanense Kott, 2001: 194 and synonymies, figs 93, 167G, pl. 10E-F.

Examined material. ZMA TU 433.4 one colony (paratype), Indonesia, Stat. 89, Siboga Expedition. FMNH 1937 one colony, Philippines, Luzon Island, Calatagan off Lago de Oro Hotel, reef, N 10-14 m depth, outer slope of fringing reef, BPHI-0431, CAL-11 (13°56'04.2" N, 120°36'20.5" E), 11/05/2014, *leg.* Paulay, G. and Uyeno, D.

Geographical distribution. Type locality: Indonesia (Sluiter, 1909). Further records: Australia (Hastings 1931, Kott 2001).

Characterization. The colony has white colour with superficial layer pigmented in preserved material. It is up to 3 cm in length and 1-2 mm in thickness. The common cloacal apertures are smooth and have white color. The cloacal cavity is thoracic and small. The tunic is smooth and breakable. They are distributed in whole. Spicules are globular with 10-14 flat-tipped rays in optical transverse section. They are about to 30 µm in diameter.

Zooids has about 1.2-1.5 mm long. The oral siphon is short with six short triangular lobes. The atrial aperture is close. The lateral thoracic organs have elongate shape, protruding, localized in the anterior half of the thorax at level of the 2nd row of stigmata. The muscular process is shorter than the thorax, projects at the anterior of the oesophageal peduncle. The oesophageal peduncle is short and straight. The abdomen is positioned horizontally in relation to the thorax. Secondary gut loop overlays the stomach. In the right side, there is a glandular tissue like a C. Gonads and larva are not present.

Remarks. The paratype specimen (ZMA TU 433.4) was designed by Van der Sloot (1969). Larva was not found in any of colonies analyzed. Kott (2001) identified the

sample ZMA TU 454.1 as *D. jedanense*, however, zooids have the characteristics, including the shape of spicules of *D. perplexum*. *Didemnum jedanense* has globular spicules as *D. albpunctatum* Sluiter, 1909, but their larva differs between both species. Kott (2001) reported *D. jedanense* to Australia and described the larva with some variation. According to her, larvae are gemmiparous and can measure between 0.7-1.2 mm and 4 or 8 short ectodermic ampullae per side. In opposite, *D. albpunctatum* has not gemmiparous larva and its larva has two adhesive papillae.

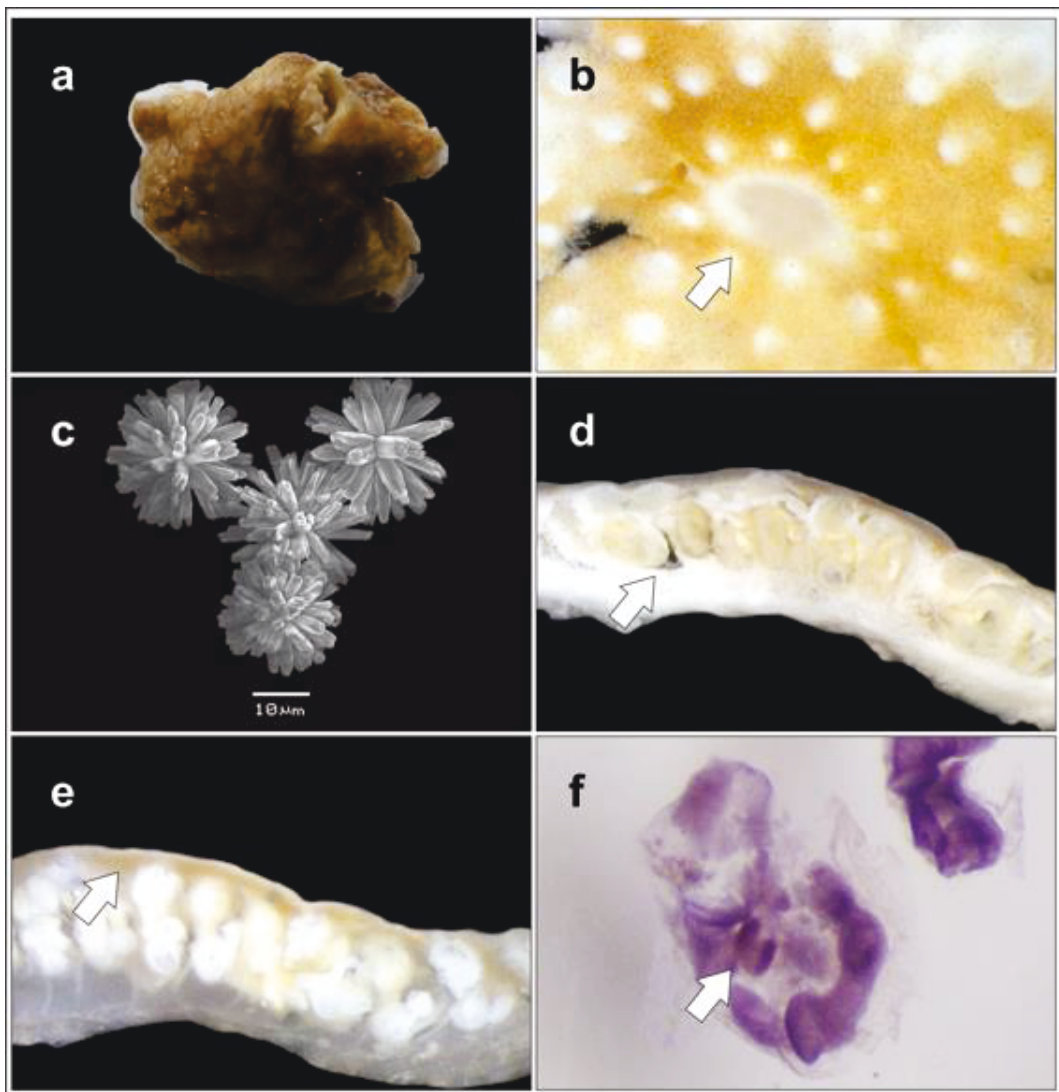


Figure 7. *Didemnum jedanense* Sluiter, 1909. a, preserved colony. b, colony surface. Arrow indicates the details of the cloacal aperture. c, spicules. d, cross section of the colony (arrow indicating the cloacal cavity). e, cross section of the decalcified colony (arrow indicating a layer of pigment above the thorax). f, stained abdomen (arrow indicating the gland below the stomach).

Didemnum jeffreysi (Herdman, 1886)

Leptoclinum jeffreysi Herdman, 1886: 295, pl. 40, fig. 6-9.

Didemnum jeffreysi: Hartmeyer, 1909-11: 1450.

Examined material. NHM 1887.2.4.436-437 one colony (type), Tangier Bay, Morocco, Challenger Expedition (Porcupine expedition), 64 m depth, 05/08/1870.

Geographical distribution. Type locality: Morocco (Herdman 1886).

Characterization. Colony is beige or white color in preserved material. It has about 3 cm in diameter and 3 mm in thickness. The common cloacal aperture is smooth edge. The cavity cloacal is thoracic and abdominal and has sand inside it. Tunic is firm, crumbly and smooth. Spicules concentration in each side of thoracic organ are present. Spicules are distributed in whole the tunic. The density of spicules is high on the colony surface, decreasing to the basal layer. Above the layer of spicules, there is a thin layer of tunic without spicules. Spicules concentration on each side of the lateral thoracic organ are present. Stellate spicules have short rays and pointed with 6-7 in optical transverse section. They are about to 25-35 μm in diameter.

The oral siphon has six long lobes. The atrial aperture is wide. Lateral thoracic organs have circular shape, not protruding, located at the level of the 4th rows of stigmata. The muscular process is shorter than the thorax, projects at the middle of the oesophageal peduncle. The oesophageal peduncle is long and straight. The abdomen is positioned horizontally in relation to the thorax. Secondary gut loop overlays the stomach. Testis is undivided, surrounded by 6 to 7 coils of the sperm duct. Larvae are not present on the colony.

Remarks. This species has all the characteristics described by Herdman (1886), except for the presence of cloacal aperture. He did see it. Here, we have more details about the species and, unfortunately, larva was not found in the present specimen.

Didemnum lahillei Hartmeyer, 1909

(Fig. 8)

Didemnoides resinaceum Drasche, 1883: 37, pl.7, fig.29; pl.11, fig.52.

Didemnum gelatinosum: Hartmeyer, 1924: 162; Kott, 1953: 76, fig. 3B-C; Millar, 1970: 35, fig. 19.

Didemnum lahillei Hartmeyer, 1909; Kott, 1952: 76, fig.3B-C; Lafargue, 1975:186, fig.9-10a-b; 1976: 187; Lafargue & Wahl, 1987: 18, fig.6d-f, pl.3c, pl.10d; Lahille, 1890: 87, fig. 31; Naranjo, 1995: 65, pl. 1c; Turon, 1986: 218, fig. 7.

Examined material. NHM 1898.9.2.1 one colony, Portland Dorset, England, 18 m depth, *leg.* Kirkpatrick, R. NHM 1967.10.6.59 (1 colony), St. Mary's, Scilly Isles, Great Britain Rock, England, 27-31 m depth. British Museum and London University SubAqua Expedition 1966.

Geographical distribution. United Kingdom (Kott 1953; Millar 1970), France (Hartmeyer 1924; Lafargue 1975 1983; Lafargue & Wahl 1987; Lahille 1890; Turon 1986), Gibraltar (Naranjo 1995), Italy (Drasche 1883).

Characterization. The colony is yellowish in preserved material and measures about 6 cm in diameter and 1 mm in length. On the colony surface, the common cloacal apertures are smooth. In the tunic, cells are abundant. The tunic is cartilaginous, but the zooids were easier to remove. The spicules are absent or in low density. When they are present, they are found at the thorax level. They have globular shape without rays no defined and 10-20 μm in diameter.

Zooids are incolors and measure about 0.8-1.0 mm long. The oral siphon is short and has six short rounded lobes. The atrial aperture is close. The thoracic lateral organs are circular, protruding and localized at the posterior region of the thorax at the level of the 3rd row of stigmata, close to the atrial aperture. The muscular process is longer of the abdomen. It has two time the size of the oesophageal peduncle. The oesophageal peduncle

is long and straight. The abdomen is positioned horizontally in relation to the thorax. The secondary gut loop overlays the stomach. The testis is undivided, surrounded by 8 to 11 coils of the sperm duct.

The larvae are elliptical, not gemmiparous, incolors, measuring about 0.8 mm of trunk. A tail windss about a way around the trunk. Three adhesive papillae close between them with peduncle long and thin. Six elongated ectodermal ampullae on each side. Sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) in the middle region of the larval trunk.

Remarks. Due the low density of spicules in the tunic, scanning electron microscope shows spicules do not so clean. *Didemnum lahille* (Hartmeyer, 1909) is a species very similar with *D. vexillum* Kott, 2002 in consistence of the colony, low density of spicules, presence of cells on the tunic and larva with six pairs of ectodermic ampullae. The mainly difference between them is the shape of the spicules. *Didemnum lahillei* has globular spicules while *D. vexillum* has stellate spicules. Lafargue (1976) described this species with details, however, in her samples, larva was not found. The specimens NHM 1898.9.2.1 and NHM 1967.10.6.59 have the same characteristics of those specimens described to France.

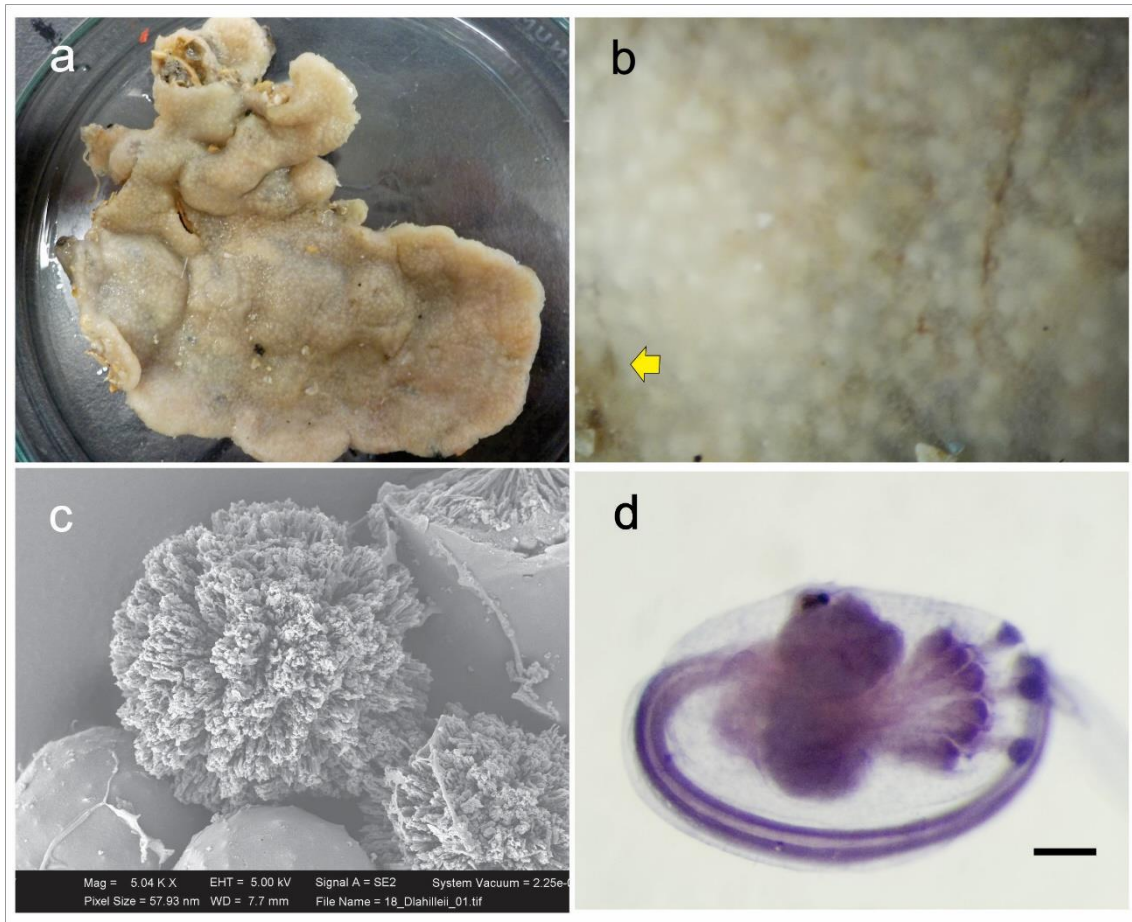


Figura 8. *Didemnum lahillei* Hatmeyer, 1909. a, preserved colony. b, colony surface. Arrow indicates the details of the cloacal aperture. c, spicule. d, stained larva. Scale bar: 0.1 mm.

Didemnum lambitum (Sluiter, 1900)

(Fig. 9)

Didemnoides lambitum Sluiter, 1900: 18, pl.4, fig.1.

Leptoclinum jugosum Herdman & Riddell, 1913: 886, pl.92, fig.1-6 (part).

Didemnum lambitum: Kott, 1954: 164, fig.54-55; 1962: 317; 1972: 18; 2001: 181.
Michaelsen, 1924: 352; Millar, 1982: 47, fig. 25.

Examined material. USNM 12567 one colony, South Island, New Zealand, South Pacific Ocean (45°37' S, 170°58' E), 51 m depth, 23/02/1965. USARP. *leg.* University Southern. ZMA TU 455 one colony (Paralectotype), Chatham Islands, New Zealand. ZMA TU 1304 one colony (Lectotype), Waitangi, Chatham Island.

Geographical distribution. Type locality: New Zealand (Sluiter 1900, Michaelsen, 1924, Millar 1982). Further records: Australia (Herdman & Riddell 1913; Kott 1962, 1972), Tasmania (Kott 1954),

Characterization. Colonies have grey color in preserved material. They are lobed and fleshy, measuring about 4-5 cm in diameter and up to 8 mm in thickness. The common cloacal apertures or cloacal systems were not observed. The colony surface smooth and lobed shape. The tunic is tough and leathery without incrustations. They are abundant on the colony surface forming a thin layer at level of branchial siphon whereas in the center of the colony or basal layer are low density, almost absent. Spicules stellate with three or four short conical rays in optical transverse section. They are about to 20 µm in diameter, but more often near 22 µm - 25 µm, occasionally to 28µm.

Zooids are incolors, measuring about 0.9 mm in length. The oral siphon has six short triangular lobes. The atrial aperture is wide, exposing almost all the pharynx. Lateral thoracic organs do not visualize. In the thorax can be visualized seven muscle fibers on each side. The muscular process is shorter the abdomen, projects at the anterior region of the oesophageal peduncle. Oesophageal peduncle short and wide. The abdomen is positioned horizontally in relation to the thorax. The secondary gut loop is very curved and overlays the stomach. Testis is undivided, surrounded by 7-8 coils of the sperm duct.

The larvae are small, oval, measuring between 0.5 to 0.6 mm of trunk. A tail winds about three-quarters of the way around the trunk. Three adhesive papillae are close together. The peduncle of the adhesive papillae is short and thin. Five or six rounded lateral ampullae on each side of the larva. Sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the mid-dorsal region of the larval trunk. The statocyte is localized anteriorly to the ocellus. Bladders cells are presents. Ozooid has three rows of stigmata.

Remarks. All the characteristics analyzed are according to Sluiter (1900) description, however he did not describe the larva. In the material analyzed, gonads were not developed in ZMA TU 455 and larva was only found in the sample ZMA TU 1304. Michaelsen (1924) described the testis with more coils of the sperm duct. Kott (1954) recorded the species to Australia waters too. Her colonies look like to be bigger than Sluiter's colonies and the sperm duct surrounded by nine coils of the sperm duct. She also showed some differences in larva which is described with 0.9 mm in length (Kott, 1954, 1962). Millar (1982) founded it in 126 m depth in New Zealand. In his samples, the zooids were contracted with 0.3 mm in length. He did not describe the larva, however showed a schema of it. His figure, the larva looks like very small, no more than 0.6 mm of trunk, a tail winds about three-quarters of the way around the trunk and four pairs of ectodermic adhesive. Perhaps, it represents another species since the larva of *D. lambitum* has six pairs of ectodermic ampullae.

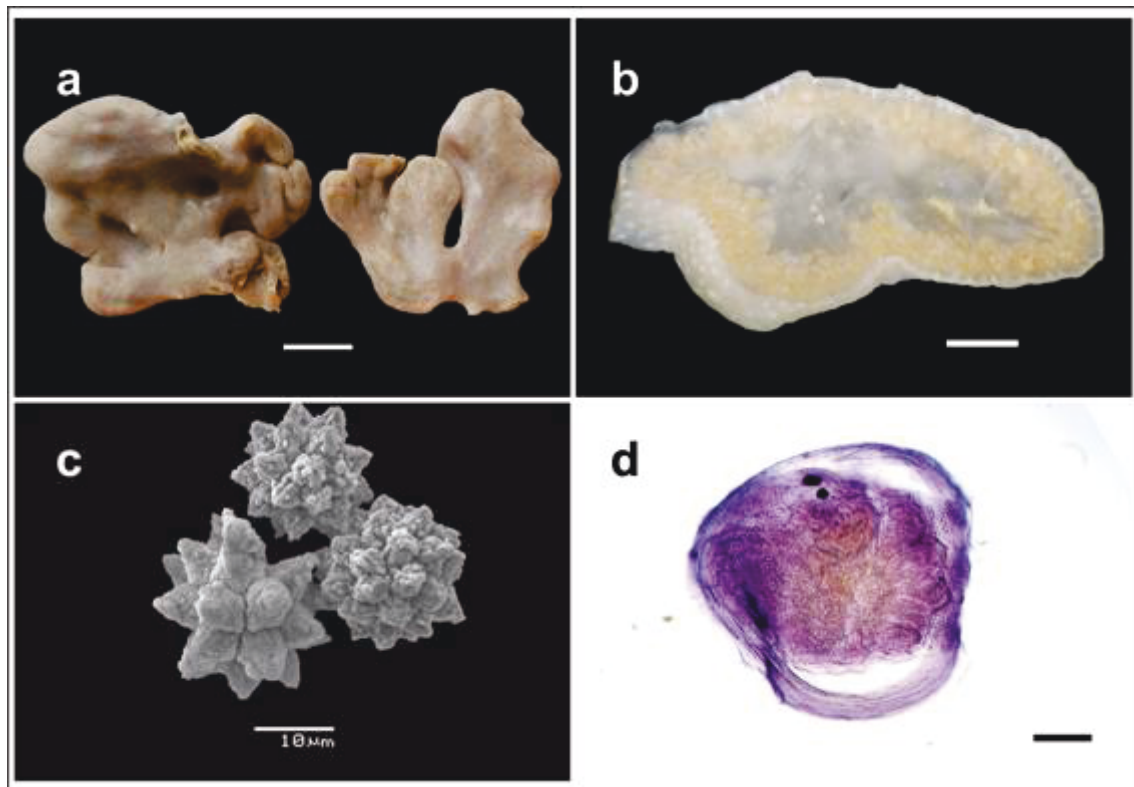


Figure 9. *Didemnum lambitum* Sluiter, 1900. a, preserved colony. b, cross section of the colony. c, spicules. d, larva. Scales bars: a-b: 1 cm. d: 0.1 mm.

Didemnum ligulum Monniot, 1983

(Fig. 10)

Didemnum ligulum Monniot 1983a: 27, fig. 11, pl. 2A; Monniot & Monniot, 1987: 34; Rocha & Monniot, 1995: 642, figs. 3A, B, C, D- PI. IC, D; Rodrigues *et al.* 1998: 66-67, fig. 8.

Examined material. DZUP Did-393 one colony, Pargos Island, Enseada do Pinguim, Rio de Janeiro, Brazil (22°51'10"S, 41°54'22"W), 13 m depth, 06/05/2014, *leg.* Skinner, L.F. DZUP Did-391 two colonies, Comprida Island, Ponta Leste, Rio de Janeiro, Brazil (22°51'41"S, 41°56'12"W), 13 m depth, 06/05/2014, *leg.* Skinner, L.F. DZUP Did-392 three colonies, Comprida Island, Ponta Leste, Rio de Janeiro, Brazil (22°51'41"S, 41°56'12" W), 13 m depth, 06/05/2014, *leg.* Skinner, L.F.

Geographical distribution. Panamá (Rocha *et al.* 2005), Guadalupe (Monniot 1983), French Polynesia (Monniot & Monniot 1987), New Caledonia (Monniot 1995).

Remarks. Our specimens are very similar with those one reported to French Polynesia (Monniot & Monniot 1987), except for the grey color as described in Monniot and Monniot description. Colonies from Paraiba are bigger than the specimens from Guadalupe and the spicules have less size. *D. ligulum* Monniot, 1983 has been reported to the Brazilian coast (Lotufo 2002, Rocha & Monniot, 1995, Rocha *et al.* 2005), found in intertidal zone and in vertical wall at 10-17 m depth. This species is very similar with *D. multispirale* Kott, 2001 from Pacific Ocean. The mainly difference between them is that *D. multispirale* larva is not gemmiparous.

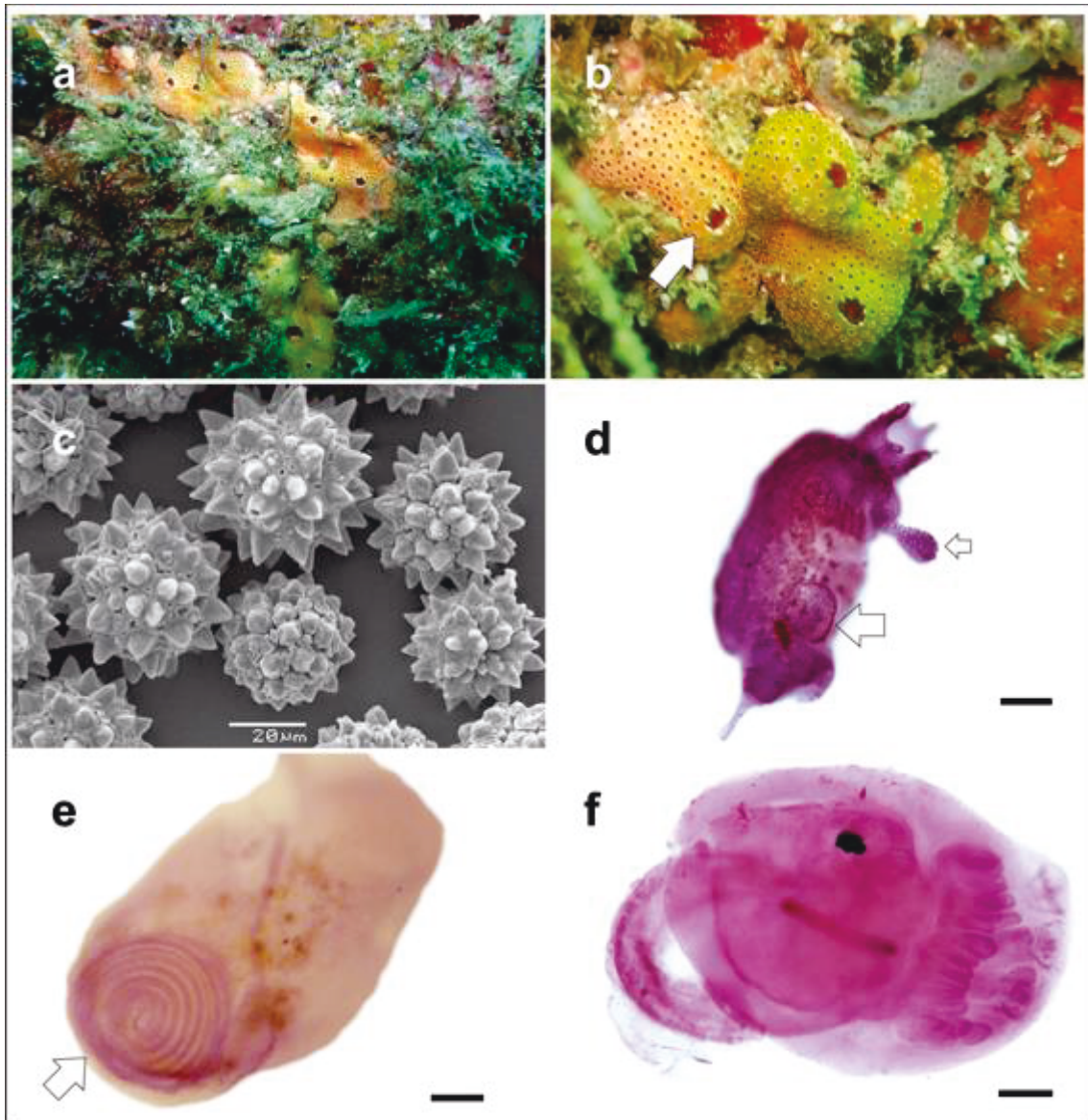


Figure 10. *Didemnum ligulum* Monniot, 1983. a-b, colonies in situ. Arrow indicates the details of the cloacal aperture. c, spicules. d, thorax (small arrow indicating the atrial languet and large arrow indicating the lateral thoracic organ). e, abdomen (arrow indicating the testis). f, larva. Zooid and larva stained with Hemalun. Scales bars: 0.1 mm. Photos: a-b: L.F. Skinner.

Didemnum maculosum (Milne Edwards, 1841)

(Fig. 11)

Leptoclinum maculosum Milne Edwards, 1841: 297

Leptoclinum tridentatum Drasche, 1883: 36, pl.8, fig.41,41a; pl.11, fig.47-48,57.

Didemnum maculosum: Lafargue 1976: 260; Lafargue & Wahl, 1987: 18, fig.6g-i, pl.2b, pl.5b1, pl.9a, and synonymies.

Examined material. ZMA TU 430, Audresselles (Dep. Pas. de Calais), France, 30/06/1957.

Geographical distribution. United Kingdom (Carlisle 1954), France (Milne-Edwards 1841, Lafargue 1976, Lafargue & Wahl 1987), Mediterranean Sea (Pérès 1959), Italy (Drasche 1883)

Characterization. Colony is white with purple pigment around the cloacal systems. It measures 7 cm in diameter and 1-2 mm in thickness. The common cloacal is smooth and large. The cloacal cavity is thoracic and small. Tunic is firm and cartilaginous. The colony surface has visible canals and papillae which are associated with the oral siphon. On each side of each lateral thoracic organs are a bag of spicules. Spicules are distributed in whole the tunic. On the colony surface, there is a thin layer of tunic without spicules. Stellate spicules have 12 short conical rays in optical transverse section and are about 30 µm in diameter.

Zooids have about 0.8-0.9 mm long. The oral siphon has six short rounded lobes. The atrial aperture is close. The lateral thoracic organs have circular shape, not protruding, located at level of the 3rd row of stigmata. The muscular process is shorter than the oesophageal peduncle. Oesophageal peduncle short and straight. The abdomen is positioned horizontally in relation to the thorax. The secondary gut loop overlays the stomach. Testis is undivided, surrounded by 5 coils of the sperm duct.

The larvae are spherical, not gemmiparous, measuring 0.4 mm of trunk. A tail winds about three-quarters of the way around the trunk. Sometimes larva shown a tail winds a complete way around the trunk. Two adhesive papillae are close together. The peduncle of the adhesive papillae is long and large. Four rounded ectodermic ampullae on each side of the larva. Sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the mid-

dorsal region of the larval trunk. The statocyte is localized anteriorly to the ocellus. Larva has many bladders cells on it.

Remarks. This specimen is according to Milne Edwards' description. The mainly characteristic that define *D. maculosum* of the majority of species of *Didemnum* is the larva with two adhesive papillae.

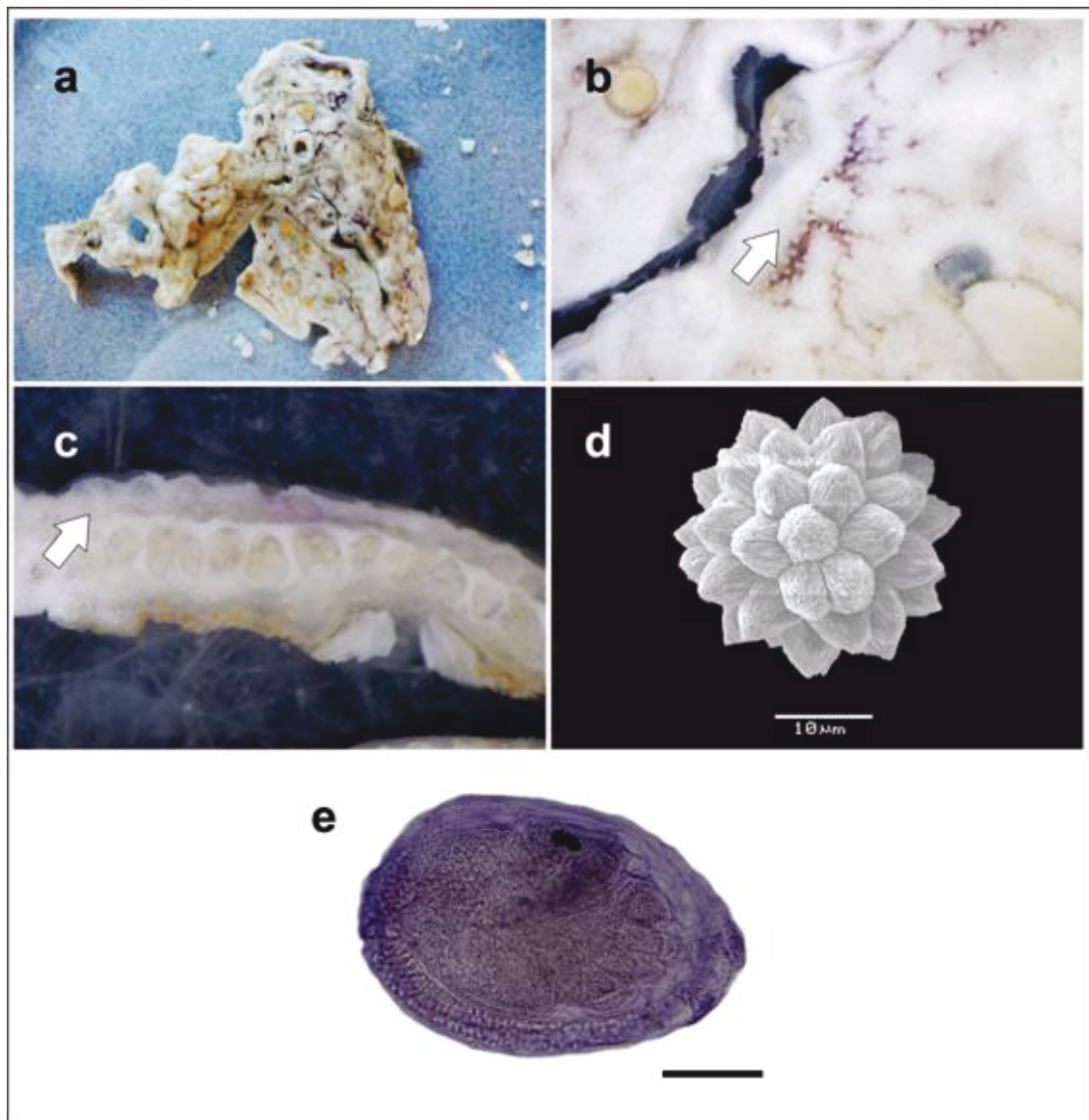


Figure 11. *Didemnum maculosum* (Milne Edwards, 1841). a, preserved colony. b, colony surface with cloacal systems visible. They are pigmented of purple colour (arrow indicating the cloacal aperture). c, cross section of the colony (arrow indicating the cloacal cavity). d, spicules. e, stained larva. Scale bar: 0.1 mm.

Didemnum macrospiculatum Tokioka, 1967

Didemnum macrospiculatum Tokioka, 1967: 71, fig.22c-d.

Examined material. USNM 11489 one colony (holotype), Onotoa Atoll, Gilbert Islands, South Pacific Ocean (1°52' S, 175°34' E), GOC-55, 25/08/1951, *leg.* Cloud, P.E. USNM 11808 one colony (paratype), Onotoa Atoll, Gilbert Islands, South Pacific Ocean (1°52' S, 175°34' E), GOC-55, 25.08.1951, *leg.* Cloud, P.E

Geographical distribution. Gilbert Islands (Tokioka 1967).

Remarks. The tunic is brittle. In the median region of the colony, spicules are not present. In both material (USNM 11489 and USNM 11808), it was not possible to dissect zooids. Apparently, they are no present on the colonies I have been analysed, however the spicules were visualized and they correspond of those ones described by Tokioka (1967).

Didemnum membranaceum Sluiter, 1909

Didemnum membranaceum Sluiter, 1909: 58. Kott, 2001: 205 and synonymies.

Examined material. AMNH 2161, Mindanao, Philippines, 14/11/1937. AMNH 2162, Mindanao, Philippines. 18/11/1937. UF 2064, Oriental Midoro Province Midoro, Puerto Galera, Philippines (13°31'34.0"N, 120°56'48.8"E), Coral Garden dive site, 7-9 m, gentle sand and reef slope, VIP15-GP-1228, GAL-112, 23/04/2015, *leg.* Paulay, G.

Geographical distribution. Indonesia (Sluiter 1909), French Polynesia (Monniot & Monniot 1987), Hong Kong (Kott & Goodbody 1981), Micronesia (Monniot & Monniot 1996), Australia (Kott 2001).

Remarks. Sluiter (1909) did a short description of *Didemnum membranaceum*. Kott (2011) found this species to Australia. Our specimens show all the characteristics described by her, including characteristics of the larva. It has 0.5 mm of trunk with four ectodermic ampullae. The lateral thoracic organ has circular shape, not protruding, located at the level of 3^a, sometimes 4^a, row of stigmata. The sample from Philippines (UF 2064) is similar in color, small size of the colony and has big spicules as showed by Kott (2001).

Didemnum molle (Herdman, 1886)

(Fig. 12)

Diplosomoides molle Herdman, 1886: 310. Sluiter, 1909: 85; 1913: 78.

Didemnum sycon Michaelsen, 1920

Didemnum molle: Kott, 2001 and synonymies

Examined material. ZMA TU 497 two colonies, Stat. 64, 32 m depth, Siboga Expedition, Indonesia. ZMA (DID 11, 5 colonies), Shark Bay ('Tien Og') on Koh Tao, Gulf of Thailand, 4-5 depth, 16/07/2016, leg. Mehrotra, R.

Geographical distribution. Philippines (Van Name, 1918), Indonesia (Sluiter, 1909), Australia (Kott, 2001)

Characterization. Colonies have globular shape with just one cloacal aperture per colony. They can be since 1-8 cm in diameter and 1 to 5 cm in thickness. The common

cloacal is smooth and large. The cloacal cavity is thoracic and abdominal. Tunic is firm and cartilaginous. It has green color due the presence of symbiotic algae. Spicules are distributed mainly on the colony surface. Globular spicules 20 short conical rays in optical transverse section and are about 25 μm in diameter.

Zooids have about 1.3 mm long. The oral siphon has six short triangular lobes. The atrial aperture is wide. The lateral thoracic organs have elongate shape, not protruding, located at level of the 4rd row of stigmata. However, they can be at level between 3rd and 4th rows of stigmata. The pharynx has about 10 stigmata on each half of each row. The muscular process is shorter than the esophageal peduncle. Esophageal peduncle short. The abdomen is positioned horizontally in relation to the thorax. The secondary gut loop does not overlay the stomach. Testis is undivided, surrounded by six or seven coils of the sperm duct.

The larvae are circular, gemmiparous with three embryos, measuring 0.9 mm of trunk. A tail winds about three-quarters of the way around the trunk. Three adhesive papillae with peduncle long and thin. Two rounded ectodermic ampullae on each side of the larva. Sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the posterior region of the larval trunk. The statocyte is localized anteriorly to the ocellus. Ozoid has three rows of stigmata. Pharynx has 10-9-9 stigmata on each half of each row of stigmata.

Remarks. The sample ZMA TU 497 had two colonies. The biggest has larva and the smaller no. The consistence of the tunic and size of the stolonial vessels of *D. molle* (Herdman, 1886) are very similar with the *Diplosoma listerianum* (Milne Edwards, 1841). The characteristics of the species have no doubts about the identification of it.

Didemnum multispirale Kott, 2001

Didemnum albopunctatum Sluiter, 1909: 58 (part); Kott 2001: 213, figs 101A-C, 166I, pl. 12A-B; 2004: 753.

Examined material. ZMA TU 433 one colony (paralectotype), Stat. 144, Siboga Expedition.

Geographical distribution. Type locality: Australia (Kott 2001, 2004)

Remarks. This species has cloacal aperture, spicules shape, atrial languet and larva with numerous ectodermic ampullae as *D. ligulum*. However, *D. multispirale* has no gemmiparous larva (Table 2) and it is from Pacific Ocean. All the characteristics corresponds of those ones described by Kott (2001).

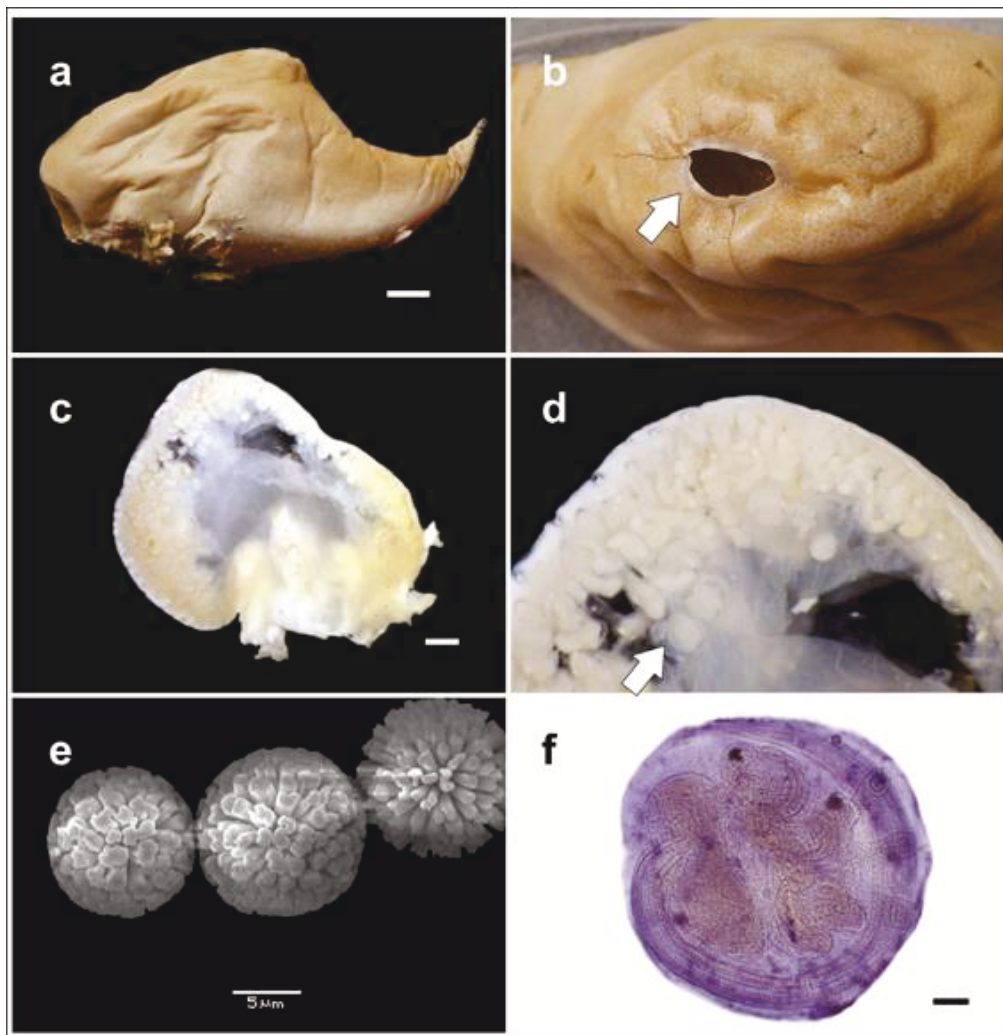


Figure 12. *Didemnum molle* (Herdmann, 1886). a, colony fixed. b, cloacal aperture. Arrow indicates the detail of the cloacal aperture (smooth). c-d, transversal section of the colony (arrow indicating the larva incubation). e, spicules. f, stained larva. Scales bars: a,c = 0.5 cm. f = 0.1 mm.

Didemnum perlucidum Monniot 1983

(Fig. 13)

Didemnum perlucidum: Monniot, 1983: 29; Monniot *et al.*, 1985: 486; Monniot & Monniot, 1987:40.

Examined material. Amostra RJ-03 one colony, Marina Porto Bracuhy, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil (22°56'59.77" S; 44°23'43.19" W), artificial substrate, 02/09/2014, *leg.* Skinner, L.F. Amostra RJ-04 one colony, Pier de Tarituba, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil (23°02'44.80" S; 44°35'43.97" W), artificial substrate, 02/09/2014, *leg.* Skinner, L.F.

Geographical distribution. Guadeloupe (Monniot, 1983), Indonésia (Monniot & Monniot 1996), Philippines, Mariana Islands (Monniot & Monniot 2001), Polynesia (Monniot *et al.*, 1985; Monniot & Monniot, 1987).

Remarks. *Didemnum perlucidum* Monniot, 1983 is very common species along the Brazilian coast (Kott 2001; Lotufo 2002; Rocha & Monniot 1995). Usually, this species has been found in artificial substrate and its considered a cryptogenic species (Dias *et al.* 2013). The lateral thoracic organs are smalls, elongated, protruding, located at level of the 4th row of stigmata. Pharynx has about seven or eight stigmata on each half of each row. The larvae are spherical, not gemmiparous, measuring between 0.44-0.55 mm of trunk. A tail winds about three-quarters of the way around the trunk. Four rounded ectodermic ampullae on each side of the larva. Sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the mid-dorsal region of the larval trunk. The statocyte is localized anteriorly to the ocellus. Oozoid has pharynx with three rows of stigmata. There are 8-7-7 stigmata on each half of each row.

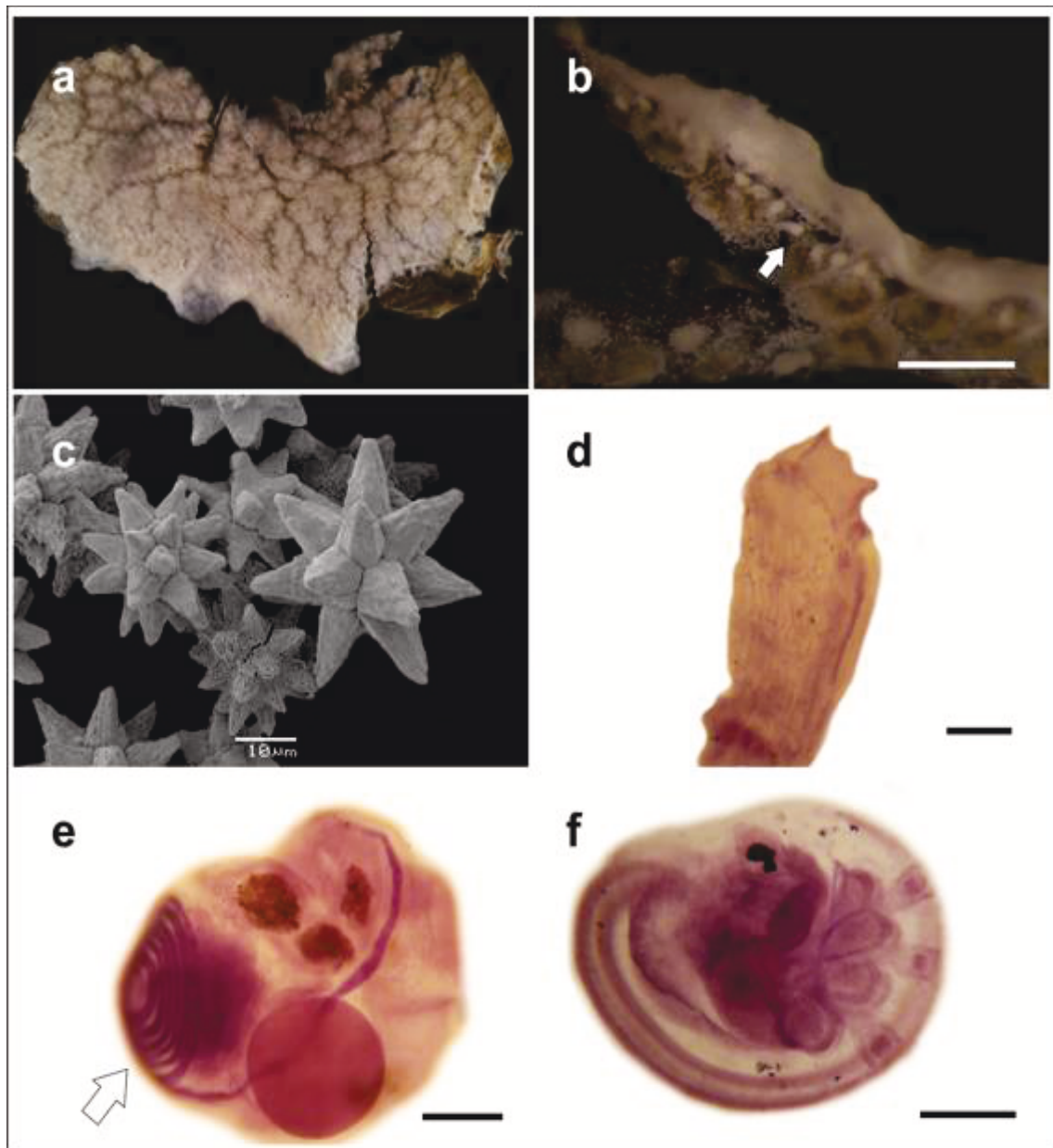


Figure 13. *Didemnum perlucidum* Monniot, 1983. a, colony fixed. b, transversal section of the colony. Arrow indicates spicules concentration on each side of the lateral thoracic organ. c, spicules. d, thorax. e, abdomen (arrow indicating the testis). f, larva. Scales bar: b = 1 mm, d-f = 0.1 mm.

Didemnum psammatores (Sluiter, 1895)

(Fig. 14)

Leptoclinum psammathodes Sluiter 1895: 171

Leptoclinum psammatores: Sluiter 1905: 20.

Hypurgon skeati Sollas, 1903: 729, plates 34-35

Didemnum candidum: Van Name 1945(part): 83, fig. 35.

Didemnum psammathodes: Monniot 1983a: 31, fig. 13, plates 2B e E; Goodbody 1984: 30; 2000: 103; 2004: 17-18; Rodrigues & Rocha 1993: 729; Monniot & Monniot 1994:73; Rocha & Monniot 1995: 645; Monniot & Monniot 1996: 163; Rodrigues *et al.* 1998: 72-73, fig. 11.

Didemnum psammatores: Kott 2001: 229, figs, 110, 168 A, plate 14 A-D.

Didemnum psammatores: Goodbody 2003: 463

Examined material. ZMA TU 1758, Piscadera bay, Curaçao. ZMA TU 1800, Grenada Hog island near pt salines. 08/07/1967. N°1550, 0-1.5 m depth, Biot: Rhizophora mud, *leg.* RUU. ZMA TU 1804, Curaçao, piscadera bay near entrance E. 28/09/1963. N°1464. Biot: Rhizophora. *Leg.* RUU. ZMA TU 1811, St. Lucia, port castries trou garnier, 11/07/1967. N°1548, 0-1.5 m depth, Biot: Rhizophora mud wreck soft, *leg.* RUU.

Geographical distribution. Texas (Lambert *et al.* 2005), Cuba, Jamaica (Goodbody 1984, 2003), Guadeloupe (Monniot 1983a), Panama (Rocha *et al.* 2005), Brazil, Ceará to São Paulo (Rodrigues & Rocha 1993; Rocha & Monniot 1995; Rodrigues *et al.* 1998; Lotufo 2002; Lotufo & Silva 2006), Saint Vincent, Grenada, St. Lucia, Belize, Aruba, Curaçao, Puerto Rico (Goodbody 1984, 2000, 2004), Sierra Leone, Senegal (Monniot & Monniot 1994), Djibouti (Sluiter 1905), Malaysia (Sollas 1903), Papua New Guinea (Monniot & Monniot 1996), Australia (Kott 2001).

Remarks. *D. psammátodes* has wide spread distribution around the world. It is usually found in shallow warm waters. Due to presence of faecal pellets on the colony surface as the mainly diagnostic character of this species, many authors do not describe the larva. The larvae of *D. psammátodes* are spherical, not gemmiparous, measuring 0.40 mm of trunk. A tail winds about three-quarters of the way around the trunk. Three adhesive papillae are close together. The peduncle of the adhesive papillae is short. There are four round-ended and elongated ectodermic ampullae on each side of the larva.

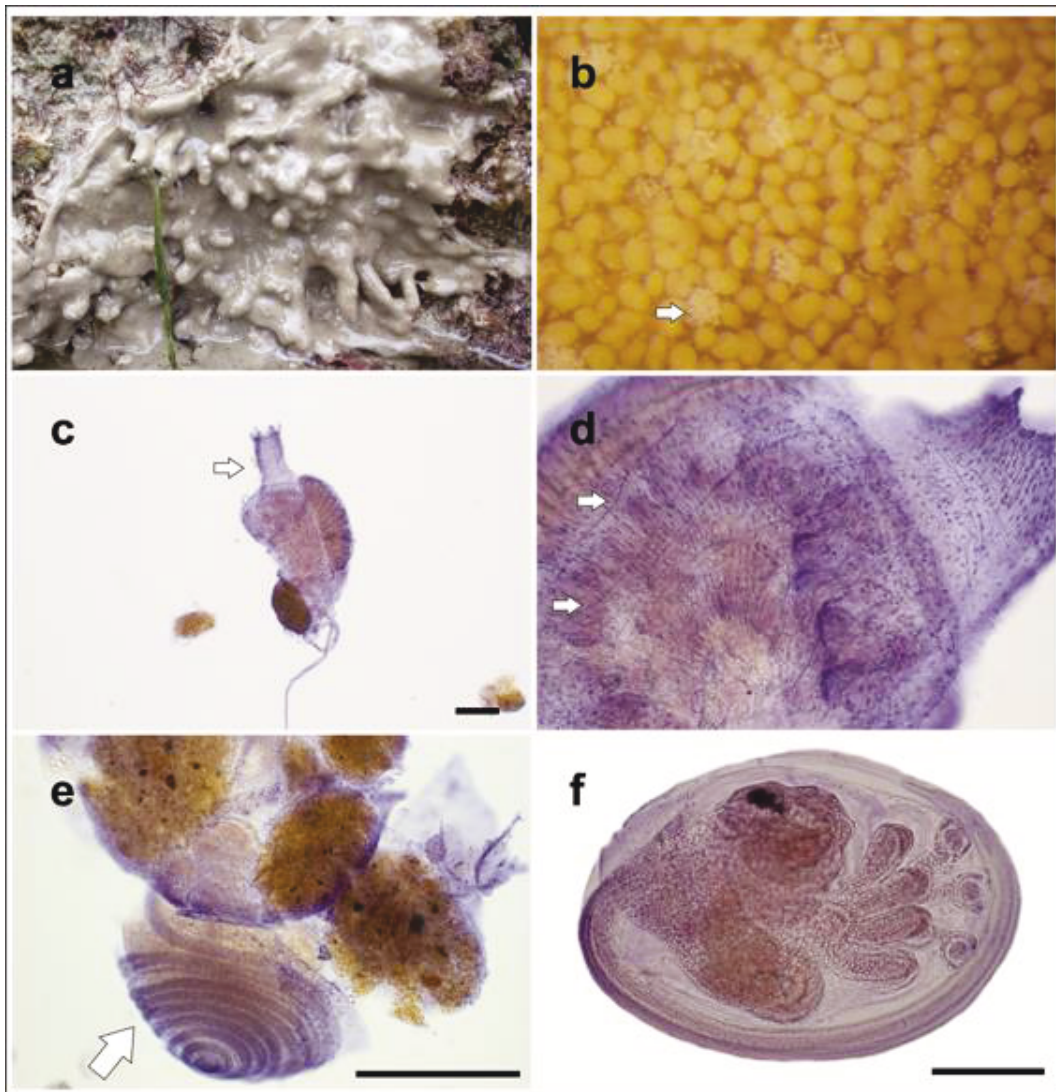


Figure 14. *Didemnum psammátodes* (Sluiter, 1895). a, colonies *in situ* from Brazil. b, detail of the colony surface, arrow pointing a concentration of spicules around an oral siphon. Specimen from Curaçao (c-f). c, thorax, arrow pointing the long oral siphon. d, closeup of the thorax showing muscular fibers (arrows). e, abdomen (arrow indicating the testis surrounded by the sperm duct). f, larva. Scales bars: 0.1 mm.

Didemnum rodriguesi Rocha & Monniot, 1993

(Fig 15)

Didemnum rodriguesi: Rocha & Monniot, 1993: 26, figs. 1-2; Monniot F., 1995: 326; Monniot F. & Monniot C. 2001: 271, fig. 55, 362, fig. 120F; Monniot *et al.*, 2001: 53, fig. 3C; Rocha & Monniot, 1995: 645. Rocha *et al.*, 2005: 467, fig. 17.

Examined material. DZUP Did-397 two colonies, Comprida Island, Ponta Leste, Rio de Janeiro, Brazil (22°53'38" S, 41°59'12" W), 13 m depth, 09/05/2014, *leg.* Skinner, L.F. DZUP Did-398 two colonies, Comprida Island, Ponta Leste, Rio de Janeiro, Brazil (22°53'38" S, 41°59'12" W), 13 m depth, 09/05/2014, *leg.* Skinner, L.F. DZUP Did-399 two colonies, Comprida Island, Ponta Leste, Rio de Janeiro, Brazil (22°53'38" S, 41°59'12" W), 13 m depth, 09/05/2014, *leg.* Skinner, L.F.

Geographical distribution. Type locality: Brazil (Rocha *et al.* 2005; Rocha & Monniot 1993, 1995). Further records: South Africa (Monniot *et al.* 2001), Papua New Guinea (Monniot & Monniot 2001), New Caledonia (Monniot 1995; Rocha & Monniot 1993).

Remarks. *D. rodriguesi* was described by Rocha & Monniot (1993) from specimens collected in Brazil and New Caledonia. This species has a peculiar characteristic that is the reticulated colony's surface. Rocha & Monniot (1993) described the larva with eight pairs of ectodermic ampullae. The larva analysed here has only five pairs of ectodermic ampullae.

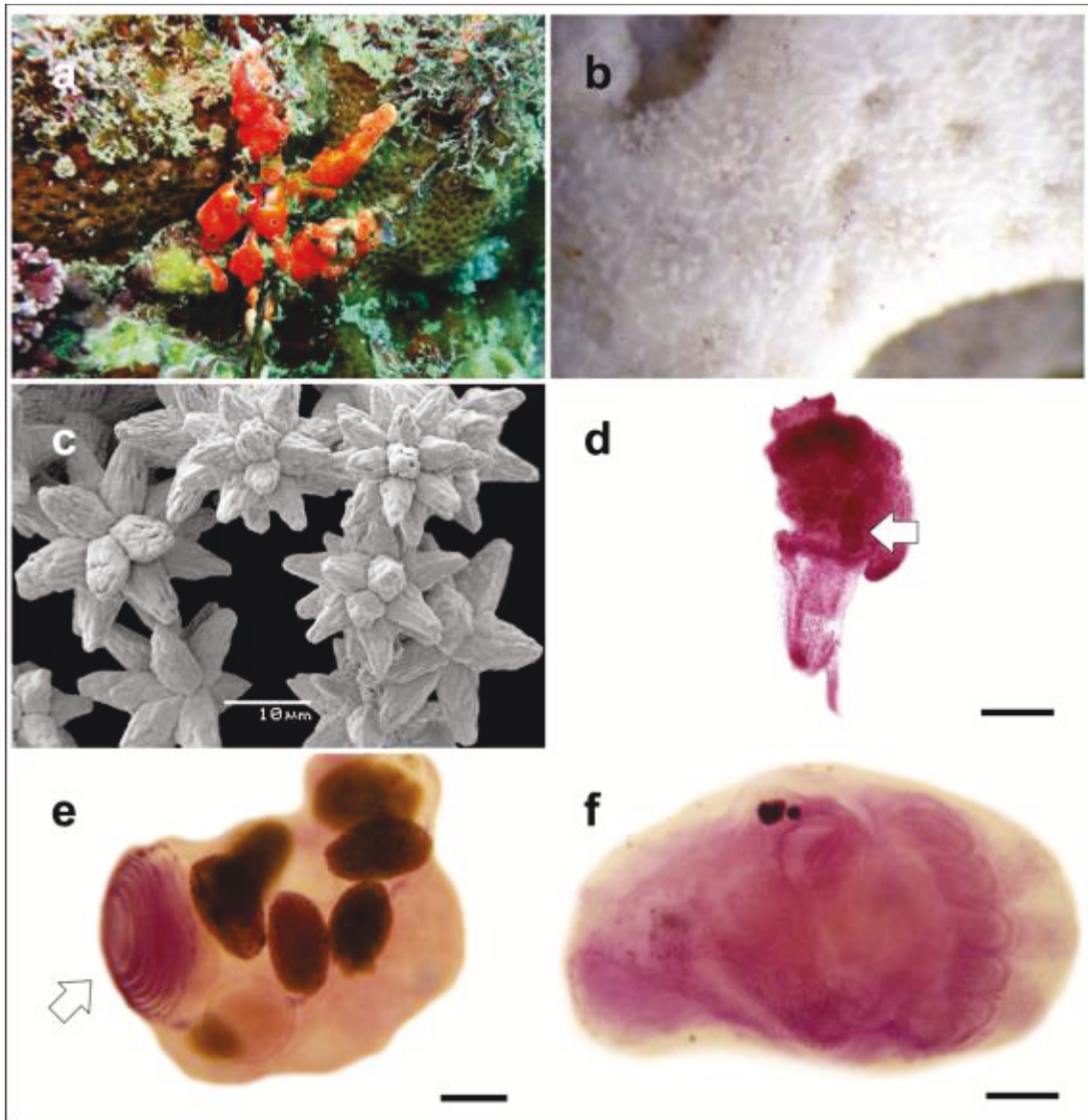


Figure 15. *Didemnum rodriguesi* Rocha & Monniot, 1993. a, colonies *in situ*. b, detail of the colony surface. c, spicules. d, thorax (arrow indicating the lateral thoracic organ). e, abdomen (arrow indicating the testis surrounded by the sperm duct). f, larva. Scale bars: 0.1 mm. Photos: a: L.F. Skinner.

Didemnum sp.

(Fig. 16)

Examined material. SMNH 25660 one colony, two slides, Red Sea, *leg.* Noa Shenkar.

Geographical distribution. Type locality: Gimsah-Bucht - Red Sea (Michaelsen 1923).

Characterization. Only a small piece of the colony (2 cm²) was available for dissection. The preserved colony is brownish with gelatinous and smooth tunic. Polychaete tubes are present inside the tunic. Spicules are distributed in the whole tunic with the highest concentrations on the colony surface and in the lobes of the oral siphons. Spicules are also concentrated on each side of the zooids, at the level of the lateral thoracic organs, where they form a pouch. They are globular and 20-35 µm in diameter, with blunt rays that can be very short and form an almost smooth surface, or a little longer and separated from each other. The cloacal apertures have a smooth rim and the common cloacal cavity is at the thoracic level forming large spaces.

Zooids are brownish and relatively large, about 1.5-2 mm in length, easy to remove from the tunic. The thorax is twice as large as the abdomen. The oral siphon is short, about 0.2 mm long, wide with six minute triangular lobes, which are almost imperceptible in some zooids. The circular musculature of the oral siphon is conspicuous. The atrial aperture is wide and exposing all the pharynx. The atrial languet is long, large, and bifurcated but it can rarely be short and pointed, when it gets broken during dissection. The pharynx has eight stigmata in the first three rows and seven in the posterior row. The thoracic lateral organs are circular and protruding, between the third and four rows of stigmata. The muscular process is shorter than the abdomen, inserted in the middle of the short esophageal peduncle. The abdomen is very small and delicate; it can easily break during dissection. The secondary gut loop overlays the stomach. Along the duodenum, there is a C-shaped structure that looks like a glandular tissue. The testis, measuring about 0.4 mm in diameter, is divided in five to seven lobes surrounded by five coils of the sperm duct. The oocyte is about 0.1 mm in diameter, when still attached to the zooid. There were no larvae in this colony.

Remarks. In Red Sea, two species of *Didemnum* were reported: *D. candidum* Savigny, 1816 and *D. granulatum* Tokioka, 1959 (Oren & Benayahu 1998; Shenkar 2012; Shenkar & Loya 2008). Both species have stellate spicules and no atrial languet. *Didemnum granulatum* also has granulated colony surface. *Didemnum* sp. does not resemble with any of those species mentioned above because of the globular shape of the spicules and of the bifurcated atrial languet.

Compare with other *Didemnum* species with atrial languet, *D. lacertosum* Monniot, 1995 has spicules with conical rays, but mostly pointed, measuring 50µm in diameter and 17-19 rays in optical transverse section; *D. ligulum* Monniot, 1983 has cloacal aperture with lobes and spicules with conical and pointed rays; *D. macrosiphonium* Kott, 2001 also has spicules with conical and pointed rays, sometimes round or flat-tipped rays, measuring 33 µm in diameter and 9-11 rays in optical section transverse; *D. multispirale* Kott, 2001 has cloacal aperture with lobes, spicules with 50 µm in diameter, 15-19 short pointed conical rays. All those species mentioned above have colonies with the high density of spicules in the tunic and larva with several pairs (more than 10) of ectodermic ampullae. In our specimen, the spicules are distributed mainly on the colony surface and larva was not found. Thus, it is possible it represents a new species based on spicules distribution and density and shape of spicules. New samples should be collected during the reproductive season to define the species.

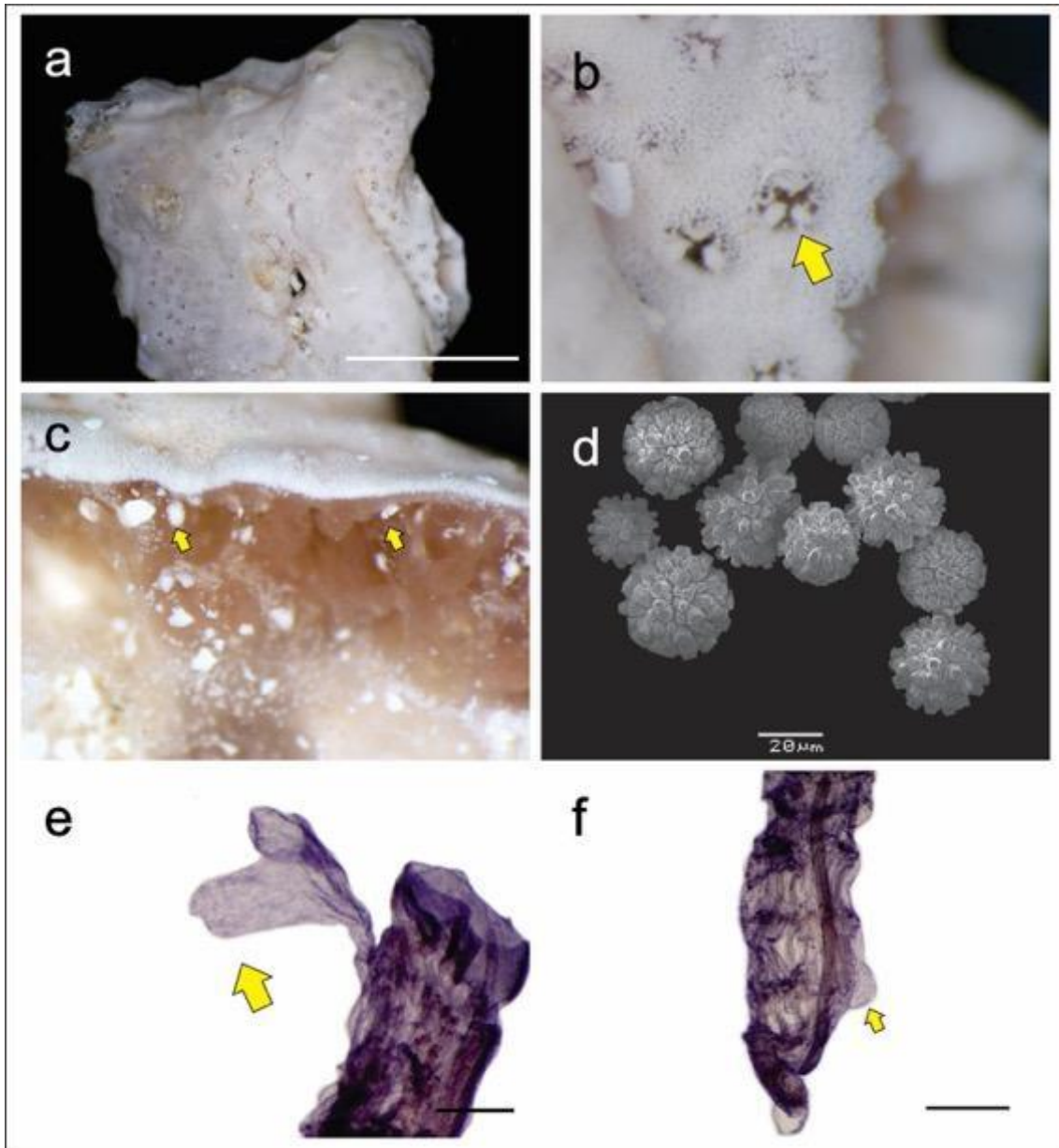


Figure 16. *Didemnum* sp. a, preserved colony. b, detail of the oral siphon with lobes (arrow). c, cross section of the preserved colony. Arrows indicate spicules concentrated in the side of the lateral thoracic organs. d, SEM of spicules. e, atrial languet bifurcated (arrow). f, lateral thoracic organ (arrow). Zooids stained with Hemalun. Scale bars: a = 1 cm. e-f = 0.2 mm.

Didemnum n. sp. 1

Examined material. ZMA TU 433.5 (originally paratype of *D. albopunctatum* Sluiter, 1909), Stat. 34, Siboga Expedition. 27/03/1899.

Geographical distribution. Indonesia.

Description. Colony has about 3 cm in diameter and it is 1 to 2 mm thick. The colony surface is black with white common cloacal apertures and colony borders in preserved material. The tunic is firm, brittle and smooth. Crowded brown and black pigment cells are scattered in the whole tunic but they are more visible when the colony is decalcified. The quantity of colored pigments in any part of the colony forms a marble-like pattern in the colony surface. The common cloacal aperture has smooth edge and in the colony analyzed only 5 or 6 cloacal apertures are present. One copepod was found in each common cloacal aperture. Spicules are distributed from the surface until the base of the colony. There are stellate, 12-35 μm in diameter with two shapes: 3-4 conical rays in optical transverse section with hexagonal bases and club-shaped, short points set in concave bases or 4 pointed rays in optical transverse section.

Zooids yellowish or brownish are about 1.1 mm in length. The oral siphon has six short rounded lobes. In some zooids, the oral siphon lobes are not well defined. The atrial aperture is wide, exposing almost the whole pharynx. The lateral thoracic organs are circular, not protruding, placed between the third and fourth stigmata row. The muscular process projects from the middle of the esophageal peduncle, which is long. The abdomen is positioned vertically in relation to the thorax. The secondary gut loop overlay the stomach. The testis is undivided, globular, measuring 0.2 mm, surrounded by 7 to 9 coils of the sperm duct.

Larval trunk is 0.5 to 0.6 mm long. A tail winds about three-quarters of the way around the trunk. The three adhesive papillae are close together, with short and thin peduncles. There are six rounded ectodermal ampullae on each side of the larva. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the mid-dorsal region of the larval trunk. The statocyte is anterior to the ocellus.

Remarks. Sluiter (1909) identified this sample as *D. albopunctatum*, however morphological analysis of the zooids, larvae and spicules showed that it is another species. *D. albopunctatum* has globular spicules and a gland tissue at the abdomen, larva with 0.4 mm of trunk, two papillae adhesive and four elongated ectodermal ampullae (Kott 2001).

Didemnum n. sp. 2

(Fig. 17)

Examined material. Holotype. [Amostra ascidia 1] one colony, Ilha Pequena, Currais, Paraná, Brazil (25°44'05" S; 48°22'15" W), 6 m, 18/12/2012, *leg.* Janaína A. Bumbeer. **Paratype.** DZUP DID-165 one colony, Currais, Paraná, Brazil (25°44'05" S; 48°22'15" W), 04/10/2002, *leg.* Rocha, R.M.

Geographical distribution. Paraná (this study).

Description. The colonies are large, more than 10 cm in diameter and 2-3 mm in thickness. The colony surface has the appearance of zebra because the brown pigmentation present in the tunic. Spicules are abundant and distributed in the whole colony, but absent over the cloacal channels. Spicules are stellate, 15-40 µm in diameter, with 7-8 conical rays sharply pointed in optical transverse section.

Zooids are 1.1 mm long. They are slightly brown pigmentation. The oral siphon is a short cylinder with 6 long pointed lobes. The atrial aperture is wide and when the zooids are very relaxed it exposes almost all the pharynx. The lateral thoracic organs are elongated, protruding and placed at the level of the 3rd row of stigmata. The muscular process projects from the posterior region of the esophageal peduncle. The testis is undivided, surrounded by 5 to 6 coils of the sperm duct.

The larvae are pigmented brown, not gemmiparous, measuring between 1.2 and 1.4 mm of trunk. A tail windss about ½ around the trunk. The three adhesive papillae

have short and wide peduncle. There are four rounded ectodermal ampullae on each side. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the mid-dorsal region of the larval trunk.

Remarks. This species is not similar to any other *Didemnum* species on the Brazilian coast. The presence of brown pigment in the tunic, as well as in the zooids and larvae distinguish the species, added by the very large larva. *D. perlucidum* has the cloacal channels marked on the surface of the tunic but without any pigment associated with those channels.

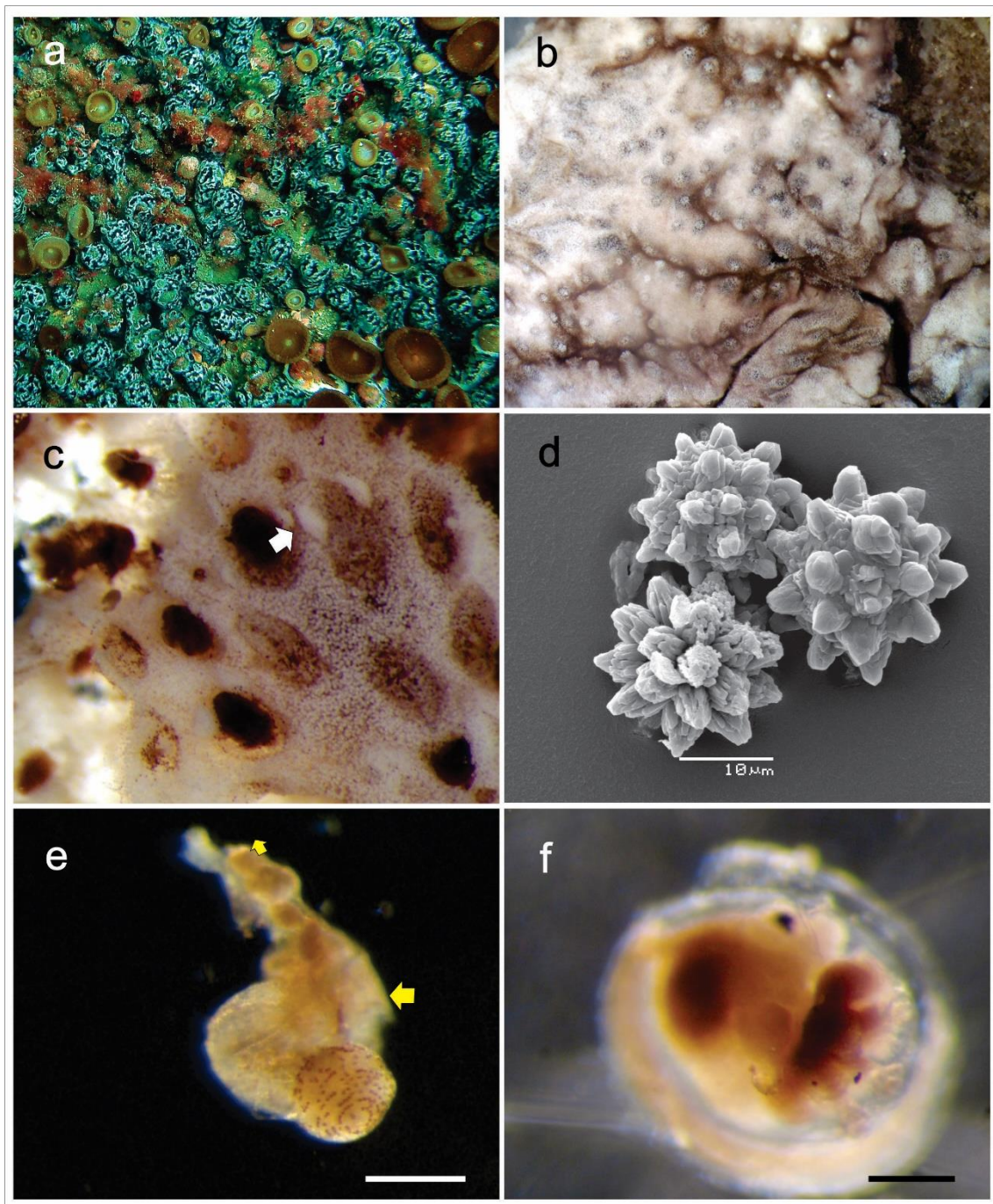


Figura 17. *Didemnum* sp. 2. A, colony *in situ*. b, detail of the colony surface. S, bags of spicules on each side of the lateral thoracic organ. d, spicules. e, abdomen (arrow indicating the testis surrounded by the sperm duct). f, larva. Scale bars: 0.1 mm. Photos: a: Bumber, J.

LITERATURE CITED

- Carlisle, D.B. (1954) Notes on the Didemnidae (Ascidacea). III. A comparison of *Didemnum maculosum*, *D. candidum*, *D. helgolandicum*, and *Trididemnum allenii*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 33, 313–324.
- Dias, G.M., Rocha, R.M., Lotufo, T.M.C. & Kremer, L.P. (2013) Fifty years of ascidian biodiversity research in São Sebastião, Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 273–282.
- Eldredge, L.G. (1966) A Taxonomic Review of Indo-Pacific Didemnid Ascidians and Descriptions of Twenty-three Central Pacific Species. *Micronesia* 2, 161–261.
- Gama, P.B., Leonel, R.M.V., Hernández, M.I.M. & Mothes, B. (2006) Recruitment and colonization of colonial ascidians (Tunicata: Ascidacea) on intertidal rocks in Northeastern Brazil. *Iheringia* 96, 165–172.
- Goodbody, I. (1984a) Ascidians from Caribbean shallow water localities. *Studies on the fauna of Curaçao and other caribbean islands* 203, 62–76.
- Goodbody, I. (1984b) The ascidian fauna of two contrasting lagoons in the Netherlands Antilles: Piscadera Baai, Curaçao, and the Lac of Bonaire. *Studies on the fauna of Curaçao and other caribbean islands* 67, 21–61.
- Goodbody, I. (2000) Diversity and distribution of ascidians (Tunicata) in the Pelican Cays, Belize. *Atoll Research Bulletin* 480, 303–333.
- Goodbody, I. (2003) The Ascidian Fauna of Port Royal, Jamaica. I. Harbor and Mangrove dwelling species. *Bulletin of Marine Science* 73, 457–476.
- Hartmeyer, R. (1912) Die Acidien der Deutschen Tiefsee-Expedition. *Deutschen Tiefsee-Expedition* 16, 225–392.
- Hartmeyer, R. (1922) Die Ascidienfauna des Trondhjemsfjords. *Norske Selskab Skrifter*, 1–48.
- Hastings, A.B. (1931) Tunicata. Great Barrier Reef Expedition 1928–29. *Scientific Reports* 4, 69–109.
- Kott, P. (1972) The Ascidians of South Australia II. Eastern Sector of the Great Australian Bight and investigator strait. *Transactions of the Royal Society of South Australia* 96, 165–196.

- Kott, P. (1981) The Ascidiaceans of the Reef Flats of Fiji. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 147–212.
- Kott, P. (2001) The Australian Ascidiacea. Part. 4: Aplousobranchia (3), Didemnidae. *Memoirs of the Queensland Museum* 47, 1–410.
- Kott, P. (2005) Ascidiaceans from the Solomon Islands. *The Beagle: Records of The Museums And Art Galleries of The Northern Territory* 21, 53–66.
- Kott, P. & Goodbody, I. (1980) The ascidiaceans of Hong Kong. In: B. S. Morton and C. K. Tseng (Eds), *The marine flora and fauna of Hong Kong and Southern China*. Hong Kong University Press, pp. 503–554.
- Lafargue, F. (1974) Description d'un néotype de *Didemnum candidum* Savigny, 1816 espece-type de mer rouge (ascidie composée). *Vie Milieu* 24, 341–356.
- Lafargue, F. (1975) Révision taxonomique des Didemnidae des Côtes de France (Ascidies composées). Les espèces de Banyuls-sur-Mer. Genre *Didemnum*. Première partie: Larves a trois ventouses. *Annales de l'Institut Océanographique, Paris* 51, 173–194.
- Lafargue, F. (1976) Révision Taxonomique des Didemnidae des côtes de France (Ascidies composées). Les espèces de Banyuls-sur-mer. Genre *Didemnum*. Deuxième partie: larves a deux ventouses. *Annales de l'Institut Océanographique, Paris* 52, 259–281.
- Lafargue, F. (1983) Inventaire des Ascidies Didemnidae de Roscoff (Tuniciers). *Cahiers de Biologie Marine* 24, 377–381.
- Lambert, G., Faulkes, Z., Lambert, C.C. & Scofield, V.L. (2005) Ascidiaceans of south Padre Island, Texas, with a key to species. *Texas Journal of Science* 57, 251–262.
- Lotufo, T.M.C. (2002) Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Lotufo, T.M.C. & Dias, G.M. (2007) *Didemnum galacteum*, a new species of white didemnid (Chordata: Ascidiacea: Didemnidae) from Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 120, 137–142.
- Lotufo, T.M.C. & Silva, A.M.B. (2006) Biota Marinha da costa oeste do Ceará. In: H. M. Cascon and T. M. C. Lotufo (Eds), *MMA, Probio*. Fortaleza, pp. 248.

- Marks, J.A. (1996) Three sibling species of didemnid ascidians from northern Norway: *Didemnum albidum* (Verrill, 1871), *Didemnum polare* (Hartmeyer, 1903), and *Didemnum romssae* sp.nov. *Canadian Journal of Zoology* 74, 357–379.
- Michaelsen, W. (1920) Die Krikobranchien Ascidien des westlichen Indischen Ozeans: Didemniden. *Jahrbuch der Hamburgischen wissenschaftlichen Anstalten* 37, 1–76.
- Michaelsen, W. (1924) Videnskabelige Meddelelser fra Dansk naturhistorisk Forening i Kjøbenhavn . , 1913–1966.
- Millar, R.H. (1988a) Ascidians collected during the South-east Pacific Biological Oceanographic Program (SEPBOP). *Journal of Natural History* 22, 225–240.
- Millar, R.H. (1988b) The occurrence of the ascidian *Didemnum albidum* (Verrill, 1871) on the West Coast of Scotland. *Sarsia* 73, 147–148.
- Milne-Edwards, H. (1841) *Observations sur les Ascidies composées des cotes de La Manche*.
- Milne Edwards, H. (1841) Observation sur les Ascidies composees des cotes de la Manche. *Memories de l'Academie (royale) des Sciencies de l'Institute (imperial) de France* 18, 217–326.
- Monniot, C. & Monniot, F. (1987) Les Ascidies de Polynésie Française. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Zoologie* 136, 1–55.
- Monniot, C. & Monniot, F. (1994) Additions to the inventory of Eastern Tropical Atlantic ascidians; arrival of cosmopolitan species. *Bulletin of Marine Science* 54, 71–93.
- Monniot, C. & Monniot, F. (1997a) Records of ascidians from Bahrain, Arabian Gulf with three new species. *Journal of Natural History* 31, 1623–1643.
- Monniot, C., Monniot, F., Griffiths, C.L. & Schleyer, M. (2001) South African Ascidians. *Annals of the South African Museum* 108, 1–141.
- Monniot, F. (1983) Ascidies littorales de Guadeloupe I. Didemnidae. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris* 5A, 5–49.
- Monniot, F. (1995) Ascidies de Nouvelle-Calédonie XV. Le genre *Didemnum*. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris* 16A, 299–344.
- Monniot, F. (2010) Some new data on tropical western Pacific Ascidians. *Zootaxa* 2561, 1–29.

- Monniot, F. (2016) Ascidiens (Tunicata) of the French Guiana Expedition. *Zootaxa* 4114, 201–245.
- Monniot, F. & Monniot, C. (1996) New Collections of Ascidiens from the Western Pacific and Southeastern Asia III. *Micronesica* 29, 167–183.
- Monniot, F. & Monniot, C. (1997b) Ascidiens collected in Tanzania. *Journal of East African Natural History* 86, 1–35.
- Monniot, F. & Monniot, C. (2001) Ascidiens from the tropical western Pacific. *Zoosystema* 23, 201–383.
- Van Name, W.G. (1902) The Ascidiens of the Bermuda Islands. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences* 11, 325–412.
- Van Name, W.G. (1921) Ascidiens of the West Indian region and Southeastern United States. *Bulletin American Museum of Natural History* 44, 283–494.
- Van Name, W.G. (1945) The North and South American ascidiens. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 84, 1–476.
- Nishikawa, T. (1990) The Ascidiens of the Japan Sea. I. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 34, 73–148.
- Oliveira-Filho, R.R. (2010) Caracterização das ascídias em regiões portuárias do Ceará. *Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza*, 111.
- Oren, U. & Benayahu, Y. (1998) Didemnid ascidiens: Rapid colonizers of artificial reefs in Eilat (Red Sea). *Bulletin of Marine Science* 63, 199–206.
- Pérès, J.M. (1959) Campagne de la Calypso en mer d’Alboran et dans la baie Ibéro-Marocaine (1958). I. Ascidiens. *Annales de l’Institut Océanographique, Paris* 4, 295–313.
- Rocha, R.M. & Bonnet, N.Y.K. (2009) Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) introduzidas no Arquipélago de Alcatrazes, São Paulo. *Iheringia* 99, 27–35.
- Rocha, R.M., Guerra-Castro, E., Lira, C., Pauls, S.M., Hernández, I., Pérez, A., Sardi, A., Pérez, J., Herrera, C., Carbonini, A.K., Caraballo, V., Salazar, D., Diaz, M.C. & Cruz-Motta, J.J. (2010) Inventory of ascidiens (Tunicata, Ascidiacea) from the National Park La Restinga, Isla Margarita, Venezuela. *Biota Neotropica* 10, 1–10.

- Rocha, R.M. & Monniot, F. (1993) *Didemnum rodriguesi* sp. nov., a new didemnid tunicate common to southern Brazil and New Caledonia. *Annales de l'Institut Océanographique* 69, 261–265.
- Rocha, R.M. & Monniot, F. (1995) Taxonomic and ecological notes on some *Didemnum* species (ascidiacea, didemnidae) from São Sebastião Channel, South-Eastern Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 55, 639–649.
- Rocha, R.M., Moreno, T.R. & Metri, R. (2005) Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22, 461–476.
- Rocha, R.M. & Nasser, C.M. (1998) Some ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from Paraná State, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 15, 633–642.
- Rodrigues, S.A., Rocha, R.M. & Lotufo, T.M. da C. (1998) *Guia ilustrado para Identificação das Ascídias do Estado de São Paulo*. FAPESP.
- Savigny, J.C. (1816) Recherches anatomiques sur les ascidies composées et sur les ascidies simples—Système de la classe des Ascidies. *Memoires sur les animaux sans vertebres* 2, 1–239.
- Shenkar, N. (2012) Ascidian (Chordata, Ascidiacea) diversity in the Red Sea. *Marine Biodiversity* 42, 459–469.
- Shenkar, N. & Loya, Y. (2008) Ecology and systematics of the ascidian fauna in the Gulf of Eilat (Aqaba). In: *Environment, Biodiversity and Preservation*, Magnes Press Jerusalem. , pp. 199–237.
- Sluiter, C.P. (1898) Beiträge zur Kenntniss der Fauna von Süd-Afrika II. Tunicaten. *Zoologische Jahrbucher. Syst.* 11, 1–64.
- Sluiter, C.P. (1909) Die Tunicaten der Siboga Expedition. Pt II. Die merosomen Ascidien. *Siboga-Expeditie* 56B, 1–112.
- Spoel, S. van der (1968) Catalogue of the type specimens of Tunicata in the Zoological Museum in Amsterdam. *Bulletin Zoologisch Museum, Universiteit van Amsterdam* 1, 157–200.
- Tokioka, T. (1954a) Contribution to japanese ascidian fauna. 7. Invertebrate fauna of the intertidal zone of the Tokara Islands. *Publications of Seto Marine Biological*

Laboratory Kyoto University 3, 239–264.

Tokioka, T. (1954b) Contributions to Japanese ascidian fauna VIII. Sporadic Memorandum. *Publications of Seto Marine Biological Laboratory Kyoto University* 4, 239–264.

Tokioka, T. (1963) Contributions to Japanese ascidian fauna. XX. The outline of Japanese ascidian fauna as compared with that of the Pacific coast of North America. *Publications of Seto Marine Biological Laboratory Kyoto University* 11, 131–156.

Tokioka, T. (1967) Pacific Tunicata of United States National Museum. *United States National Museum Bulletin* 251, 1–247.

Tokioka, T. (1970) Ascidians from Mindoro Island, the Philippines. *Publications of Seto Marine Biological Laboratory Kyoto University* 18, 75–107.

Capítulo 2: Taxonomia integrativa e delimitação das espécies *Didemnum calliginosum*, *D. cineraceum* e *D. vanderhorsti* (Ascidacea, Didemnidae)

LIVIA DE MOURA OLIVEIRA, ARJAN GITTENBERGER, MARCOS SOARES BARBEITOS & ROSANA MOREIRA DA ROCHA

Abstract

In the Atlantic Ocean, many species of *Didemnum* have a low density of spicules in the colony, dark pigmentation in the tunic and testis undivided with 7-10 coils of the sperm duct. Determining the number of species in the genus has been troublesome. This study aims at delimiting species using a fragment of the cytochrome oxidase 1 gene (COX1). We have analysed 42 specimens which were collected from the Caribbean Sea to Southern Brazil, plus one specimen from Eilat Gulf and one from Galapagos. Species delimitation was based on analysis of molecular data and corroborated by morphological information. Molecular phylogeny reconstruction was conducted using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses, while species delimitation analyses were performed with Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD), Barcode Index Number System (BIN), Bayesian Poisson Tree Processes (BPTP) and morphology. Molecular trees recovered six clades, supported by high values of bootstrap (>70) and of posterior probabilities (≥ 0.99). This study shows that four species occur in Brazil: *D. cineraceum*, *Didemnum* sp.1 (possibly *D. vanderhorsti*), and two new species, one well delimited in the molecular analysis and another only established by morphological characters. *Didemnum* sp. 1 is also present in Panama and possibly Galápagos, while *D. calliginosum* is only present in the Caribbean Sea. The sample from Eilat Gulf is likely a sixth species, distinct from those already mentioned.

Key-words: Molecular phylogeny, colonial ascidians, species complex, COX1.

2

² Capítulo formatado de acordo com a Zoologica Scripta.

Resumo

No Oceano Atlântico, há várias espécies de *Didemnum* que possuem baixa densidade de espículas na colônia, pigmentação escura na túnica e testículo único com 7-10 voltas do espermiduto, o que dificulta a avaliação do número de espécies com as mesmas características. Este trabalho tem por objetivo delimitar espécies através do uso do gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (COX1) e reavaliar a identidade dos espécimes estudados. Os 42 espécimes analisados foram coletados na costa oeste do Oceano Atlântico desde o Caribe ao Sul do Brasil, com adição de um do Golfo de Eilat e de um de Galápagos. Os dados moleculares foram combinados com informações morfológicas para delimitar as espécies. As análises realizadas para a reconstrução filogenética molecular foram as de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana e para a delimitação de espécies, Automatic Barcoding Gap Discory (ABGD), Barcode Index Number System (BIN) e Bayesian Poisson Tree Processes (BPTP). A filogenia molecular revelou seis clados distintos, suportados por altos valores de bootstrap (>70) e probabilidade posterior ($\geq 0,99$). Nas análises de delimitação de espécies foram recuperados entre cinco e seis MOTUs, refletindo os mesmos clados da filogenia molecular, os quais também foram confirmados através da análise morfológica. Dessa forma, este trabalho demonstra que no Brasil ocorre *D. cineraceum*, *Didemnum* sp. 1 (possivelmente *D. vanderhorsti*) e duas novas espécies, uma delas revelada pela análise molecular e outra apenas com dados morfológicos. *Didemnum* sp. 1 também está presente no Panamá e possivelmente Galápagos, enquanto que *D. calliginosum* está presente apenas no Caribe. O material de Eilat parece pertencer a uma sexta espécie, distinta das já citadas.

Palavras-chave: Filogenia molecular, ascídias coloniais, complexo de espécies, COX1.

Introdução

Em didemnídeos são encontradas muitas dificuldades em delimitar complexos espécies e/ou espécies crípticas por causa da pequena variação interespecífica entre os zooides, variação intraespecífica das espículas e das semelhanças entre as espículas de espécies distintas, bem como a ausência de larvas e/ou gônadas desenvolvidas em muitos exemplares, principalmente em *Didemnum*.

No Oceano Atlântico Oeste, três espécies de *Didemnum* possuem colônias com consistência gelatinosa, pigmentação escura na túnica, baixa densidade de espículas e testículo único com 7-10 voltas do espermiduto (Monniot 1984; Van Name 1924, 1945; Sluiter 1898). Além disso, algumas características morfológicas da colônia, zooides e larvas de *D. calliginosum* Monniot, 1984 sobrepõem as da espécie *D. vanderhorsti* Van Name, 1924 (Monniot 1984; Van Name 1924), levando a hipótese de que ambas as espécies poderiam ser sinônimas. Além disso, a larva de *D. vanderhorsti* foi descrita apenas em 1995 a partir de espécimes brasileiros por Rocha & Monniot (1995). Monniot (1983) não faz nenhuma menção a *D. vanderhorsti* quando descreve a espécie *D. calliginosum* e apenas compara esta com *D. cineraceum*, abordando as semelhanças entre as colônias de ambas as espécies e as características únicas que definem cada uma delas, como por exemplo o tamanho, número de embriões e número de ampolas ectodérmicas na larva (Monniot 1984, 1995).

As três espécies, *D. calliginosum*, *D. cineraceum* e *D. vanderhorsti* foram descritas para Guadalupe, Jamaica e Curaçao, respectivamente (Monniot 1984; Van Name 1924; Sluiter 1898), sendo Guadalupe o único registro para *D. calliginosum*. A espécie *D. cineraceum* possui uma distribuição mais ampla, com registros em Serra Leoa na costa africana (Monniot & Monniot 1994), Nova Caledônia (Monniot 1995, 2007), na região caribenha como Guadalupe, Jamaica e Venezuela (Goodbody 2003; Monniot 1983; Rocha *et al.* 2010) e nos estados do Ceará e São Paulo, na costa brasileira (Dias *et al.* 2013; Oliveira-Filho 2010; Rocha *et al.* 2011; Rocha & Bonnet 2009; Rodrigues *et al.* 1998). Já *D. vanderhorsti* foi registrada na Jamaica, Tortugas e Curaçao (Goodbody 1984; Van Name 1945) e também em toda costa brasileira, do estado do Ceará a Santa Catarina (Lotufo 2002; Lotufo & Silva 2006; Millar 1958; Rocha *et al.* 2011; Rocha & Monniot 1995; Rodrigues *et al.* 1998).

As análises filogenéticas moleculares podem ajudar a esclarecer a identificação taxonômica das espécies (Leduc & Sinniger 2017). Assim, a combinação de informações

genéticas com informações morfológicas para delimitar de espécies, tornam-se cada vez mais comuns (Cruz-Barraza *et al.* 2012; Gutiérrez-Valencia *et al.* 2017; Heethoff *et al.* 2011; Padula *et al.* 2014; Razkin *et al.* 2017; Weis & Melzer 2012). Nos últimos anos, a citocromo oxidase (COX1) vem sendo utilizada em análises comparativas das sequências do gene entre diferentes organismos para separar geneticamente populações de espécies invasoras (Hess *et al.* 2009) ou com ampla distribuição geográfica (Stefaniak *et al.* 2009), através da técnica conhecida com código de barras genético (genetic barcoding - Hirose *et al.* 2009, 2010; Hirose & Hirose 2009), bem como em estudos de biogeografia, de delimitação de espécies (Gutiérrez-Valencia *et al.* 2017; Razkin *et al.* 2017; Tarjuelo *et al.* 2001; Vandepas *et al.* 2015) e de genética de populações (Pérez-Portela *et al.* 2013). Dessa forma, este estudo tem como objetivos delimitar as espécies de *D. calliginosum*, *D. cineraceum* e *D. vanderhorsti* através do uso da COX1 e da análise morfológica das espécies, além de avaliar a identidade dos espécimes estudados.

Metodologia

Abreviações

AMNH Museu Americano de História Natural, Nova Iorque, Estados Unidos

DZUP Coleção de Ascidiacea do Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Brasil

SMNH Museu Steinhardt de História Natural e Centro de Pesquisa Nacional, Tel-Aviv University, Israel

ZMA Museu de Zoologia de Amsterdam, parte do Naturalis Biodiversity Center, Países Baixos

Amostragem

A maioria dos espécimes foram provenientes de diversas coletas realizadas em Bocas del Toro, Panamá e ao longo da costa brasileira entre 1996 e 2017. Foram também incluídas uma amostra de Galápagos, uma do Golfo de Eilat, em Israel (SMNH) e duas amostras coletadas em Curaçao e depositadas no Museu Americano de História Natural (AMNH) e no Museu de Zoologia de Amsterdam (ZMA). Grande parte do material utilizado no estudo morfológico estava preservado em formalina a 4%. O material usado

tanto para a análise morfológica quanto para a extração de DNA foi anestesiado com cloreto de magnésio misturado com mentol em água do mar por aproximadamente 2 h. Um pedaço de cada colônia foi diretamente fixado em etanol a 96% para garantir a alta qualidade de DNA para as análises genéticas.

Para delimitar morfológicamente as espécies de *Didemnum* Savigny, 1816 foi utilizada a morfologia externa da colônia, espículas, zooides e larvas. Todas as características foram comparadas à descrição original de cada espécie e também às demais descrições e registros presentes na literatura. Exceto os espécimes de Curaçao, todos os demais estão depositados na Coleção de Tunicata do Departamento de Zoologia (DZUP) da Universidade Federal do Paraná, Brasil. As espículas calcárias foram examinadas sob o microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6360LV com um revestimento rápido de ouro no Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal do Paraná, Brasil.

Extração de DNA

Parte das extrações de DNA foram realizadas usando um robô de extração Kingfisher e outra parte utilizando o kit de extração da Invitrogen® by Life technologies. Um pequeno pedaço de cada colônia (3 ou 4 mm³) contendo túnica e zooides foi utilizado para isolar o DNA. Eles foram suspensos em um tubo de 2 ml com T1-Lysis buffer e ProtK e em seguida macerados e incubados a 56 °C em centrífuga a 250 rpm durante a noite. Posteriormente, seguiu-se o protocolo Kingfisher ou Invitrogen para tecido animal.

Amplificação da PCR e sequenciamento

Protocolo 1 (Kingfisher) - Naturalis Biodiversity Center

A reação de amplificação da PCR seguiu o protocolo da Phire Green Hot Start II DNA Polymerase com algumas modificações. O mix da reação de PCR foi realizado num volume total de 25 µl, sendo 5 µl de 5x Phire Green Reaction Buffer, 1,3 µl de coquetel de primers Forward 10pMol/µl (Didopt_for/Tun_for), 1,3 µl de cocktail de primers Reverse 10pMol/µl (Didopt_rev/Tun_rev2), 1,5 µl de dNTP (2,5 mM), 0,5 µl de Phire II Hotstart II DNA taq Polymerase, 1 µl de template e 14,4 µl de água ultrapura. Após a desnaturação inicial a 98 °C durante 30s, foram efetuados 60 ciclos de PCR constituídos

de 5s de desnaturação a 98 °C, anelamento de iniciadores a 45 °C durante 5s e extensão a 72 °C durante 15s. Após os ciclos, efetuou-se uma extensão final de 72 °C durante 5 min. Nós utilizamos os iniciadores específicos de tunicados e iniciadores específicos de *Didemnum* desenhados para este trabalho (Tabela 2).

Protocolo 2 (Invitrogen) - Universidade Federal do Paraná

Para reação de amplificação da PCR seguiu-se o protocolo da taq Phire Green Hot Start II DNA Polymerase com modificações na preparação do mix. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 µl, sendo 2,5 µl de 10x Platinum Reaction Buffer, 1 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de BSA (100 mM), 1 µl de primer Forward 10pMol/µl (Tun_for), 1 µl de primer Reverse 10pMol/µl (Tun_rev2), 0,5 µl de dNTP (2,5 mM), 0,3 µl de Platinum taq DNA Polymerase, 1 µl de template e 16,7 µl de água ultrapura. As reações de PCR foram efetuadas utilizando os mesmos parâmetros descritos acima, com exceção do número de ciclos que foram reduzidos para 40. Os iniciadores utilizados foram aqueles reportados por Stefaniak *et al.* (2009) (Tabela 2).

Análise de dados

As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas na base de dados online do Genbank, através do algoritmo BLAST implementado no NCBI (Johnson *et al.* 2008). Estas sequências foram montadas usando o programa Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) e alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.* 1994), implementado no Programa Bioedit versão 7.2.5 (Hall 1999). Como grupo externo utilizamos *Didemnum albidum* (acesso Genbank EU419432) por ser uma espécie com sequência e posicionamento filogenético já conhecidos. Posteriormente, todas as sequências foram re-alinhadas e os cromatogramas re-avaliados. As sequências foram editadas manualmente nos casos de regiões que não foram satisfatoriamente resolvidas pelo programa. Após esta etapa, foi realizada a tradução das sequências em aminoácidos utilizando-se o programa MEGA versão 7 (Kumar *et al.* 2016) a fim de se verificar a presença de possíveis pseudogenes com códons de paradas entremeados nas regiões codificantes. Elas também foram verificadas através do banco de dados online BOLD v.4 (<http://www.barcodinglife.org>; Ratnasingham & Hebert 2007).

Reconstrução filogenética

As reconstruções filogenéticas foram baseadas em dois critérios: máxima verossimilhança (MV) e inferência Bayesiana (IB). A árvore de MV foi gerada através do programa RAxML-HPC2 (v8.2.10) implementado no sistema XSEDE, disponível no portal CIPRES v.3.3. (Miller *et al.* 2010; Stamatakis 2014). O suporte foi estimado por 1000 pseudo-replicações de bootstrap. Para IB, empregou-se o programa MrBayes (v3.2.6), também implementado no sistema XSEDE (Ronquist *et al.* 2012). A análise Bayesiana foi realizada utilizando-se 2 corridas com 4 cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) de 10⁶ gerações cada.

Delimitação dos MOTUs (Molecular Operational Taxonomic units)

Para validar a identidade de *D. calliginosum*, *D. cineraceum* e *D. vanderhorsti*, foram utilizados quatro métodos distintos para delimitação de espécies: Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD; Puillandre *et al.* 2012), Barcode Index Number System (BIN; Ratnasingham & Hebert 2013), Bayesian Poisson Tree Processes (BPTP; (Zhang *et al.* 2013). Os métodos de delimitação molecular foram corroborados pelo estudo morfológico dos caracteres dos exemplares.

A análise de ABGD foi utilizada com o objetivo de testar se os clusters compreendem espécies crípticas por causa da diversidade intraespecífica encontrada e dos altos valores de suporte dos ramos. Esta análise foi realizada através do servidor ABGD web (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>) com as configurações padrão. Para a análise bPTP, a qual utiliza uma abordagem baseada em coalescência para a delimitação de espécies, a árvore obtida com RAxML-HPC2 foi usada como arquivo de entrada no servidor web bPTP (<http://species.h-its.org/>). A cada sequência foi atribuída um BIN, para distinguir intervalos (barcode gaps) nas distâncias genéticas entre grupos de indivíduos, tendo como referência o banco de dados genéticos BOLD v.4. Para a construção da árvore filogenética, foi utilizado o modelo de distância Kimura de 2 parâmetros, que fornece correção mais precisa de pequenas distâncias genéticas (Kimura 1980).

Tabela 1. Espécimes utilizados nas análises morfológicas e moleculares, incluindo o número de acesso do BOLD ou Genbank para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase 1 e localidade de coleta.

Espécie	Voucher morfologia	Acesso COX1	Localidade	Coordenadas Geográficas
<i>Didemnum calliginosum</i>	DZUP DID-410		Hospital Point, Bocas del Toro, Panamá	9°20'04" N, 82°13'10" W
<i>Didemnum calliginosum</i>	DZUP DID-728	UPDID007-17	Marina Bocas, Bocas del Toro, Panamá	9°20'08" N, 82°14'04" W
<i>Didemnum calliginosum</i>	DZUP DID-400	UPDID008-17	Marina Bocas, Bocas del Toro, Panamá	9°20'08" N, 82°14'48" W
<i>Didemnum calliginosum</i>	DZUP DID-401		Crawl Key, Bocas del Toro, Panamá	9°20'13" N, 82°08'10" W
<i>Didemnum cineraceum</i>	DZUP DID-402		Town Docks, Bocas del Toro, Panamá	9°20'13" N, 82°14'25" W
<i>Didemnum cineraceum</i>	ZMA TU 157		St Jorisbaai, Curaçao	12°07'35,8" N, 68°48'34" W
<i>Didemnum cineraceum</i>	DZUP DID-346	UPDID001-17	Marina Mercado Modelo, Salvador, Bahia, Brasil	12°58'21" S, 38°30'56" W
<i>Didemnum cineraceum</i>		UPDID002-17	Marina Mercado Modelo, Salvador, Bahia, Brasil	12°58'21" S, 38°30'56" W
<i>Didemnum cineraceum</i>	DZUP DID-190		Quebramar Sul, Salvador, Bahia, Brasil	12°58'22" S, 38°31'09" W
<i>Didemnum cineraceum</i>	DZUP DID-149		Portinho de Itaparica, Salvador, Brasil	12°53'30" S, 38°41'02" W
<i>Didemnum cineraceum</i>	DZUP DID-90		Porto Petrobrás, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°48'07" S, 45°23'27" W
<i>Didemnum cineraceum</i>		KU221192	São Paulo, Brasil	
<i>Didemnum</i> sp.1	DZUP DID-755	UPDID017-17	Porto Petrobrás, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°48'07" S, 45°23'27" W
<i>Didemnum</i> sp.1	DZUP DID-757	UPDID006-17	Marina Bocas, Bocas del Toro, Panamá	9°20'08" S, 82°14'48" W
<i>Didemnum</i> sp.1		UPDID150-17	Hospital Point, Bocas del Toro, Panamá	9°20'04" S, 82°13'10" W
<i>Didemnum</i> sp.1	DZUP DID-585	UPDID003-17	Franklin Cove, Isla Santa Cruz, Galápagos, Equador	0°45'00" S, 90°19'00" W
<i>Didemnum</i> sp.2	SMNH65	UPDID018-17	Golfo de Eilat, Israel	39°30'33,8" S, 34°55'28" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-729	UPDID012-17	Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°41'23" S, 40°23'24" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-731	UPDID013-17	Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°41'23" S, 40°23'24" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-731	UPDID013-17	Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°41'23" S, 40°23'24" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-730	UPDID014-17	Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°41'23" S, 40°23'24" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-732	UPDID015-17	Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°41'23" S, 40°23'24" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-754	UPDID016-17	Ilha Escalvada, Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°41'58" S, 40°24'27,82" W
<i>Didemnum</i> sp.3		UPDID158-17	Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil	20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-735	UPDID009-17	Ilha Comprida, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil	22°51'41" S, 41°56'12" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-733	UPDID010-17	Ilha Comprida, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil	22°51'41" S, 41°56'12" W

Tabela 1. Continuação.

Espécime	Voucher morfologia	Acesso COX1	Localidade	Coordenadas Geográficas
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-734	UPDID011-17	Ilha dos Papagaios, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil	22°53'55" S, 41°58'42" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-736		Ilha dos Búzios, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°49'00" S, 45°09'00" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-743		Ilha dos Búzios, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°49'00" S, 45°09'00" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-744		Ilha dos Búzios, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°49'00" S, 45°09'00" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-748		Ilha dos Búzios, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°49'00" S, 45°09'00" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-749		Ilha dos Búzios, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°49'00" S, 45°09'00" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-750	UPDID004-17	Ilha dos Búzios, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°49'00" S, 45°09'00" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-746	UPDID005-17	Ilha dos Búzios, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°49'00" S, 45°09'00" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-738		Ilha dos Búzios, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°49'00" S, 45°09'00" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-737		Naufrágio DART, Ilhabela, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°55'04" S, 45°27'24" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-745		Naufrágio DART, Ilhabela, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°55'04" S, 45°27'24" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-747		Naufrágio DART, Ilhabela, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°55'04" S, 45°27'24" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-751		Ilha Serraria, São Sebastião, São Paulo, Brasil	23°48'54" S, 45°13'44" W
<i>Didemnum</i> sp.3		UPDID139-17	Alcatrazes, São Sebastião, São Paulo, Brasil	24°6'66.7" S, 45°42'12.7" W
<i>Didemnum</i> sp.3		UPDID140-17	Alcatrazes, São Sebastião, São Paulo, Brasil	24°6'66.7" S, 45°42'12.7" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-752	UPDID141-17	Alcatrazes, São Sebastião, São Paulo, Brasil	24°6'66.7" S, 45°42'12.7" W
<i>Didemnum</i> sp.3		UPDID142-17	Alcatrazes, São Sebastião, São Paulo, Brasil	24°6'66.7" S, 45°42'12.7" W
<i>Didemnum</i> sp.3		UPDID143-17	Alcatrazes, São Sebastião, São Paulo, Brasil	24°6'66.7" S, 45°42'12.7" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-753	UPDID144-17	Alcatrazes, São Sebastião, São Paulo, Brasil	24°6'66.7" S, 45°42'12.7" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-740	UPDID145-17	Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil	27°17'08" S, 48°22'25" W
<i>Didemnum</i> sp.3		UPDID146-17	Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil	27°17'08" S, 48°22'25" W

Tabela 1. Continuação.

Espécime	Voucher morfologia	Acesso COX1	Localidade	Coordenadas Geográficas
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-742	UPDID147-17	Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil	27°17'08" S, 48°22'25" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-739	UPDID148-17	Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil	27°17'08" S, 48°22'25" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-741	UPDID149-17	Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil	27°17'08" S, 48°22'25" W
<i>Didemnum</i> sp.4	DZUP DID-337		Naufrágio Victory 8B, Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°41'23" S, 40°23'24" W
<i>Didemnum</i> sp.4	DZUP DID-338		Ilha Escalvada, Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°42'00" S, 40°24'30" W
<i>Didemnum</i> sp.4	DZUP DID-339		Naufrágio Victory 8B, Guarapari, Espírito Santo, Brasil	20°41'23" S, 40°23'24" W
<i>Didemnum</i> sp.4	DZUP DID-1.54		Praia do Baleeiro, São Paulo, Brasil	

Tabela 2. Genes e iniciadores usados neste estudo e suas referências.

Gene	Nome iniciador	Sequência do primer (5' à 3')	Comp	Temp. anelamento	Referência
COI	Tun_for	TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATT AG	~ 600	45 °C	Stefaniak <i>et al.</i> 2009
COI	Tun_rev2	AAC TTG TAT TTA AAT TAC GAT C	~ 600	45 °C	Stefaniak <i>et al.</i> 2009
COI	Didopt_for	TCT ACT AAT CAT AAA GAC ATT AG	~ 600	45 °C	Este estudo
COI	Didopt_rev	AAC TAG TAT TTA AGT TAC GAT C	~ 600	45 °C	Este estudo

Resultados

Foram obtidas 31 sequências de COX1, das quais 15 eram haplótipos distintos. Nenhum códon de parada foi detectado nas sequências de COX1 nem gaps. Dos 586 pares de bases comparados, 236 são variáveis e 149 são informativos de acordo com o critério de máxima parcimônia. Um total de cinco clados foram identificados, correspondendo às seguintes espécies: *D. calliginosum* Monniot, 1984, *D. cineraceum* (Sluiter, 1898), *Didemnum* sp.1 (possível *D. cf. vanderhorsti*), *Didemnum* sp.2 e *Didemnum* sp.3, além de *Didemnum* sp.4 para a qual foi realizada apenas uma análise morfológica, pois nenhuma sequência foi obtida.

Nossos resultados também mostraram que as distâncias genéticas interespecíficas são significativamente maiores que as distâncias intraespecíficas no caso de COX1. Entre as 31 sequências estudadas aqui, a distância genética média interespecífica foi de 12,7%, enquanto que a intraespecífica foi de 1%. A menor distância genética interespecífica foi encontrada entre *Didemnum* sp.2 e *Didemnum* sp.3 (7,9%) e a máxima distância entre *D. cineraceum* e *Didemnum* sp.3 (15,6%). As distâncias médias intraespecíficas variaram de 0,2% a 2,6%. *Didemnum calliginosum* e *D. cineraceum* apresentaram as menores distâncias (0,2%) e *Didemnum* sp. 1 e *Didemnum* sp.3 mostraram os maiores valores médio intraespecíficos, 2,6% e 0,9%, respectivamente (Tabela 3).

As filogenias obtidas das análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) para as sequências de COX1 não apresentaram grandes diferenças

topológicas entre si, exceto para os OTUS do clado maior (*Didemnum* sp.3). Neste clado, o comprimento dos ramos internos é pequeno na árvore de MV e na árvore da IB resultou em uma grande politomia. Por causa dessa semelhança topológica entre as árvores, apenas a árvore da IB é mostrada (Figura 1), na qual os valores de bootstrap também são indicados nos ramos.

A filogenia revelou cinco clados distintos com um deles representado por apenas um espécime. Quatro dos cinco clados são suportados por altos valores de bootstrap ($>70\%$) e probabilidade posterior $>0,99$. Para o clado com espécime único (*Didemnum* sp.2), incluir mais indivíduos nas análises é um dos objetivos para um estudo futuro, permitindo melhor avaliar a sua diversidade genética e uma análise morfológica mais detalhada, a fim de melhor esclarecer a identidade da mesma.

O ramo de *D. cineraceum* formou o clado mais basal com suporte significativo de bootstrap de 99% e probabilidade posterior de 1, agrupando espécimes da mesma região biogeográfica (Bahia e São Paulo). O ramo que suporta *D. cineraceum* como grupo-irmão dos demais espécimes não mostrou um valor significativo de bootstrap ($\leq 40\%$), porém a probabilidade posterior foi $>0,99$ (Fig. 1). O segundo clado, o qual foi denominado *Didemnum* sp.1 (possível *D. vanderhorsti*), forma um grupo monofilético com valores de bootstrap de 92% e probabilidade posterior de 1. Este clado agrupa um espécime do Panamá, um de São Paulo (Brasil) e um de Galápagos com uma possível distinção entre o espécime coletado em Galápagos (Pacífico) daqueles coletados no Atlântico Oeste. No entanto, para se ter a certeza de que estes espécimes representam espécies distintas, novos espécimes deveriam ser incluídos em uma nova análise. O terceiro clado *D. calliginosum* é formado por espécimes coletados no Panamá, o qual também forma um clado monofilético com valores de bootstrap de 92% e probabilidade posterior de 1. O único espécime do Golfo de Eilat, *Didemnum* sp. 2, está como grupo-irmão de *Didemnum* sp. 3 de acordo com a análise Bayesiana ($\geq 0,99$), embora o suporte de bootstrap não tenha sido significativo (MV $<30\%$). O ramo de *Didemnum* sp.3 é formado por sete haplótipos distintos, os quais foram coletados na região centro-sul do Atlântico Oeste, desde o Espírito Santo até Santa Catarina, no Brasil. A sequência UPDID0004-17 da Ilha de Búzios, São Sebastião-SP, separa-se das demais sequências do mesmo clado com valor de bootstrap de 100% e probabilidade posterior de 1, mas não foram observados caracteres morfológicos distintivos com as demais espécies de *Didemnum* sp.3. Apesar de alguns ramos não possuírem valores significativos de bootstrap, o método do código

de barras genético mostrou-se adequado para resolver os relacionamentos entre os espécimes deste grupo de espécies em *Didemnum* (Figura 1).

Com base nos métodos formais de delimitação de espécies, a análise de ABGD revelou seis ramos distintos, com cinco intervalos de códigos de barras entre eles. BPTP é uma análise baseada em coalescência e, assim como ABGD, ela foi mais conservativa e reconheceu seis ramos monofiléticos distintos, enquanto que BIN revelou sete clados distintos. A análise morfológica foi consistente com os resultados da filogenia molecular, indicando cinco clados distintos. BIN e BPTP detectaram, em *Didemnum* sp.1, outras duas prováveis espécies putativas, bem como ABGD e BIN detectaram duas prováveis espécies putativas em *Didemnum* sp.3. Entretanto, cada um dos grupos (*Didemnum* sp.1 e *Didemnum* sp.3) foi considerado como sendo uma única espécie devido à falta de características diagnósticas que pudessem separar as espécies.

No conjunto de espécies analisadas, *D. cineraceum* é a única que apresenta larvas gemíparas. Além disso, as larvas são grandes com 6 a 11 ampolas em cada lado (fig. 5), *Didemnum* sp. 3 também apresenta larvas grandes com mais de 1 mm de tronco, mas não são gemíparas e apresentam apenas 4 pares de ampolas (fig. 9g). As demais espécies com larva conhecida, apresentam larva pequena (entre 0,4-0,6 mm de tronco) com 4 pares de ampolas (figs. 2b, 7e-f e 10e). Entre estas últimas, *D. calliginosum* se distingue pela presença de um tecido glandular sobre a alça intestinal primária no lado direito do abdome (fig. 2a), *Didemnum* sp.1 (possível *D. vanderhorsti*) por conter maior densidade de espículas na túnica e não conter esse tecido glandular no abdome (fig. 7a), *Didemnum* sp. 2 pelos zooides de coloração marrom e testículo lenticular (fig. 8d), e *Didemnum* sp. 4 pelas espículas grandes (até 50 µm) de raios cônicos (fig. 10b) (Tabela 5).

Em relação aos zooides verificou-se que a posição e formato dos órgãos torácicos laterais podem ser úteis para separar as espécies, sendo que *D. calliginosum* e *D. cineraceum* apresentam formato e posição iguais dos órgãos torácicos laterais (figs. 3d e 4e, tabela 5). Quanto às espículas, quando presentes, elas possuem formatos semelhantes (globulares), exceto e *Didemnum* sp. 4 que possuem espículas estreladas, porém elas se diferenciam no formato e número de raios em secção transversal óptica, bem como no tamanho da espícula (Tabela 5).

Tabela 3. Distância média genética intra e inter (diagonal) específicas de *Didemnum* calculada pelo método p-distance. Os valores abaixo da diagonal são as distâncias entre os haplótipos, enquanto que os valores acima da diagonal indicam a significância do bootstrap para 999 repetições ($\alpha = 0,05$).

Haplótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 UPDID007-17_ <i>D. calliginosum</i>		0,002	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,012
2 UPDID008-17_ <i>D. calliginosum</i>	0,002	0,002	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
3 KU221192_ <i>D. cineraceum</i>	0,142	0,140		0,002	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
4 UPDID001-17_ <i>D. cineraceum</i>	0,140	0,139	0,002	0,002	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
5 UPDID003-17_ <i>Didemnum</i> sp.1	0,128	0,128	0,140	0,142		0,007	0,008	0,013	0,014	0,015	0,015	0,015	0,014	0,015	0,014
6 UPDID017-17_ <i>Didemnum</i> sp.1	0,134	0,134	0,135	0,137	0,031		0,004	0,013	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
7 UPDID150-17_ <i>Didemnum</i> sp.1	0,140	0,140	0,144	0,146	0,039	0,009	0,026	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
8 UPDID018-17_ <i>Didemnum</i> sp.2	0,096	0,096	0,132	0,130	0,134	0,130	0,135	-	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011
9 UPDID012-17_ <i>Didemnum</i> sp.3	0,104	0,103	0,147	0,146	0,140	0,135	0,139	0,079		0,006	0,003	0,002	0,003	0,002	0,003
10 UPDID004-17_ <i>Didemnum</i> sp.3	0,111	0,110	0,156	0,154	0,154	0,149	0,152	0,091	0,024		0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
11 UPDID009-17_ <i>Didemnum</i> sp.3	0,103	0,104	0,149	0,147	0,144	0,139	0,142	0,079	0,005	0,026		0,002	0,002	0,002	0,002
12 UPDID010-17_ <i>Didemnum</i> sp.3	0,104	0,103	0,147	0,146	0,144	0,139	0,142	0,079	0,003	0,024	0,002	0,009	0,002	0,000	0,002
13 UPDID139-17_ <i>Didemnum</i> sp.3	0,106	0,104	0,149	0,147	0,146	0,140	0,144	0,080	0,005	0,026	0,003	0,002		0,002	0,002
14 UPDID140-17_ <i>Didemnum</i> sp.3	0,104	0,103	0,147	0,146	0,144	0,139	0,142	0,079	0,003	0,024	0,002	0,000	0,002		0,002
15 UPDID145-17_ <i>Didemnum</i> sp.3	0,103	0,101	0,146	0,144	0,142	0,137	0,140	0,079	0,005	0,026	0,003	0,002	0,003	0,002	

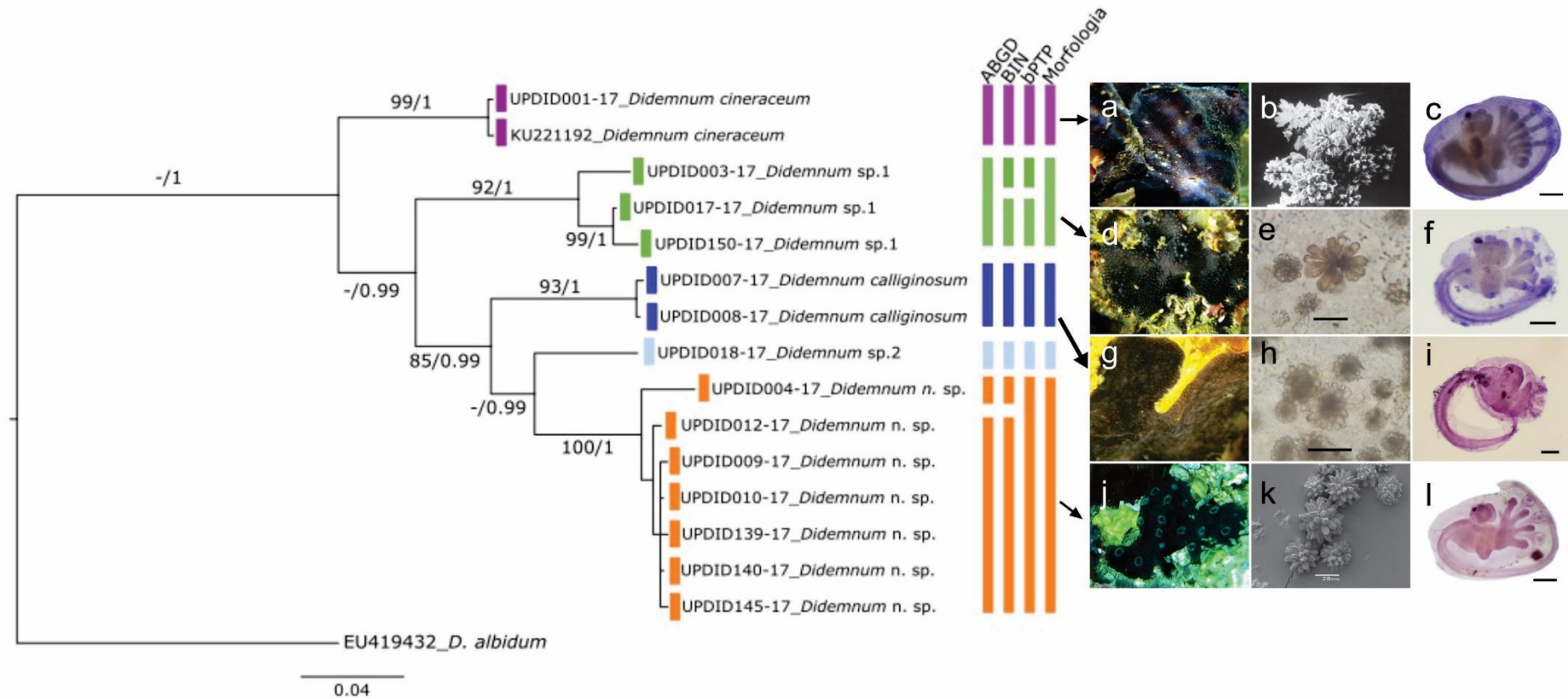


Figura 1. Árvore consenso bayesiana da regra da maioria baseada em 586 nucleotídeos para o gene COX1 de 32 indivíduos de *Didemnum* spp. As cores representam uma espécie. As barras verticais representam os resultados das análises de delimitação de espécies: ABGD, BIN, bPTP e morfologia. Os números nos ramos são valores de suporte de bootstrap e probabilidade posterior, respectivamente. A árvore foi enraizada com *D. albidum* (EU419432).

Descrição das espécies

Ordem APLOUSOBRANCHIA Lahille, 1886

Família DIDEMNIDAE Giard, 1872

Gênero *Didemnum* Savigny, 1816

Didemnum calliginosum Monniot, 1984

(figs. 2 e 3)

Didemnum calliginosum Monniot, 1984: 891, fig. 2a-c, pl. 1c.

Material examinado. DZUP DID-410, Hospital Point, Bocas del Toro, Panamá (9°20'04" S, 82°13'10" W), 1 colônia, lâmina DID 4.24, 4 m, 20/08/2006, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-728, Marina Bocas, Bocas del Toro, Panamá (9°20'8" N, 82°14'48" W), 1 colônia, lâmina DID 4.25, 21/06/2014, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-400, Marina Bocas, Bocas del Toro, Panamá (9°20'8" N, 82°14'48" W), 1 colônia, lâmina DID 4.26, 21/06/2014, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-401, Crawl Key, Bocas del Toro, Panamá (9°20'13" N, 82°08'10" W), 1 colônia, 23/06/2014, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. As colônias apresentam coloração que varia marrom claro ao negro, medem 2-4 cm de diâmetro e 1-2 mm de espessura. As aberturas cloacais são circulares e apresentam borda lisa. As espículas são pouco abundantes e encontram-se distribuídas irregularmente, deixando algumas regiões na superfície da colônia mais claras. Elas estão presentes em apenas algumas regiões da colônia, algumas vezes, envolvendo o abdome do zooide. Estas espículas medem de 10-20 µm de diâmetro e apresentam formato globular com 10 raios cilíndricos em seção transversal; os raios apresentam fissuras ou ranhuras e extremidades um pouco arredondas.

Os zooides são incolores, com cerca de 1 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos e arredondados. A abertura atrial é ampla e expõe metade da faringe, exceto quando o zooide está bem contraído. A faringe tem cerca de 8-10 fendas em cada fileira. Os órgãos laterais torácicos são circulares, pequenos e salientes, localizando-se a altura da 3ª fileira de fendas, próximo ao endóstilo ou mais centrais. O processo muscular

é mais longo que o abdome, projetando-se na região anterior do pedúnculo esofágico-retal. A alça intestinal secundária sobrepõe-se ao estômago. Logo abaixo deste, sobre a alça intestinal primária, encontra-se um tecido glandular em forma de meia-lua. O testículo é único, globular, rodeado por 6-7 voltas do espermiduto, geralmente 7.

As larvas não são gemíparas e medem 0,5 mm de comprimento de tronco. A cauda faz $\frac{3}{4}$ de volta ao redor do tronco. As papilas adesivas possuem o pedúnculo curto e fino. As larvas possuem quatro pares de ampolas arredondadas, com as dorsais mais alongadas. A vesícula sensorial (estatocito e ocelo) está localizada na região dorsal central da larva.

Comentários. *Didemnum calliginosum* foi reportada apenas para Guadalupe, de onde foi descrita (Monniot 1984) e posteriormente encontrada em Bocas del Toro (Neves 2015), porém este registro não foi publicado e os espécimes foram utilizados aqui para a obtenção das sequências de COX1.

Distribuição Geográfica. Localidade tipo: Guadalupe (Monniot, 1984). Outras localidades: Panamá (este trabalho).

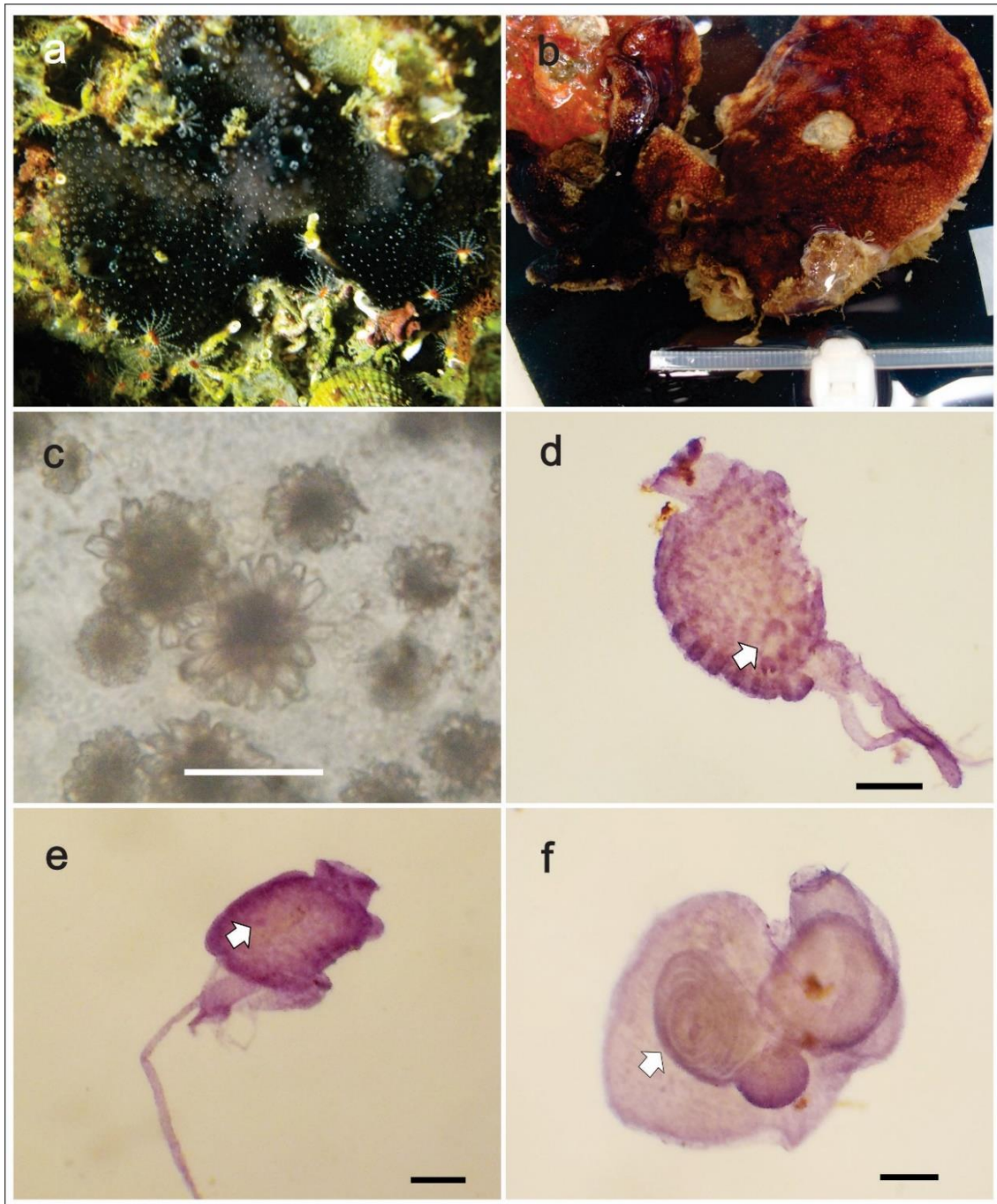


Figura 2. *Didemnum calliginosum* Monniot, 1984. a, Colônia *in situ* em Marina Bocas. b, Colônia viva de outra coloração, em laboratório - Espécime de Hospital Point. c, Espículas - Espécime DZUP DID-728. d-e, Tórax com a seta indicando o órgão torácico lateral. Em d, visualiza-se o processo muscular longo. f, Abdome com a seta indicando o testículo globular recoberto pelas voltas do espermiduto (lado esquerdo do abdome) (zooides corados com hematoxilina). Escalas: b = 5 cm; c = 15 μ m; d-f = 0,1 mm.

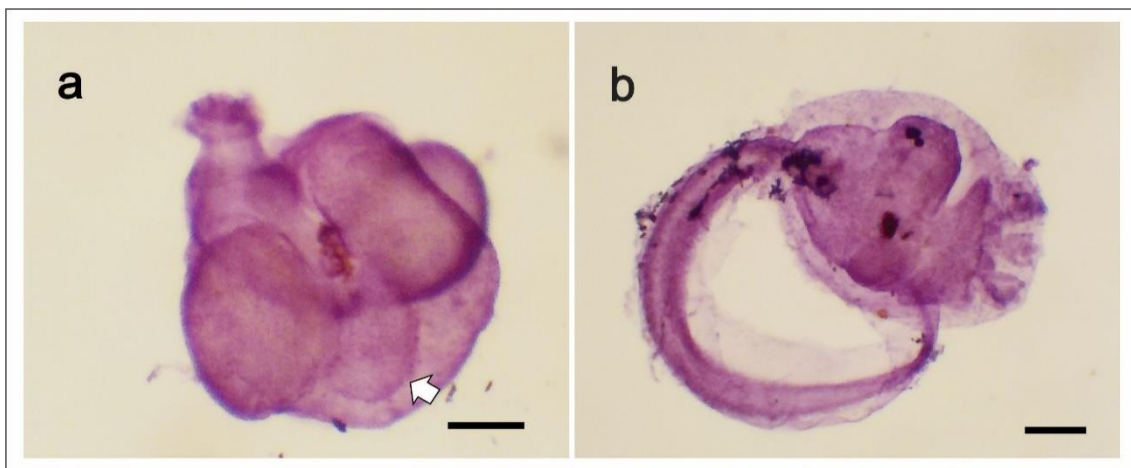


Figura 3. *Didemnum calliginosum* Monniot, 1984. a, Abdome com a seta indicando o tecido glandular (lado direito do abdome). E, larva (zooides e larvas coradas com hematoxilina). Escalas: 0,1 mm.

Didemnum cineraceum (Sluiter, 1898)

(figs. 4 e 5)

Leptoclinum cineraceum Sluiter, 1898: 30, pl.2, fig.41, pl.3, fig.48.

Didemnum cineraceum: Van Name 1921: 484; Monniot, 1983: 21; 1995: 303, fig.3, pl.1c, 3f. Oliveira-Filho, 2010: 45; Monniot & Monniot, 1994: 72.

Material examinado. DZUP DID-402, Town Docks, Bocas del Toro, Panamá (9°20'13" N, 82°14'25" W), 1 colônia, lâmina DID-4.23, 06/08/2008, *leg.* Rocha, R.M. ZMA TU 157, St. Joris Baai, Curaçao (12°07'35,8" N, 68°48'34" W), 1 colônia, 30/11/1958, *leg.* Stock, J.H. DZUP DID-346, Marina Mercado Modelo, Salvador, Bahia, Brasil (12°58'21" S, 38°30'56" W), 1 colônia, 02/03/2012, *leg.* Neves, I.M. DZUP DID-190, Quebramar Sul, Salvador, Bahia, Brasil (12°58'22" S, 38°31'09" W), 1 colônia, 9-11 m, 07/08/1999, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-149, Portinho de Itaparica, Salvador, Brasil (12°53'30" S, 38°41'02" W), 1 colônia, 5 m, 04/08/1999, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-90, Porto Petrobrás, São Sebastião, São Paulo, Brasil (23°48'07" S, 45°23'27" W), 1 colônia, lâmina DID 1.78, 30/01/1996, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. No material preservado em formalina, as colônias apresentam coloração marrom clara ou cinza claro, medem até 10 cm de diâmetro e de 1-2 mm de espessura. A túnica é translúcida e lisa. As aberturas cloacais são circulares e os canais cloacais torácicos. As espículas encontram-se ausentes em algumas colônias, porém nos espécimes de São Paulo (Brasil) e do Panamá, elas são pouco abundantes. As espículas observadas são globulares, possuem numerosos raios curtos e cônicos (8-10) em seção transversal, com as extremidades subdivididas, variando de 13 a 30 µm de diâmetro.

Os zooides são incolores, medindo de 1-1,5 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos e triangulares. A abertura atrial é pequena e quase não expõe as fendas faríngeas da região mediana do tórax. A faringe tem 10-9-9-8 fendas em cada fileira, respectivamente. O órgão lateral torácico possui formato de aba, localizando-se na altura da 4ª fileira de fendas, próximo ao endóstilo. O processo muscular é extremamente fino e mais longo que o abdome, projetando-se da região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é curto e largo. O abdome posiciona-se horizontalmente em relação ao tórax. A alça intestinal secundária sobrepõe-se ao estômago. Quatro vasos estoloníferos projetam-se na região posterior do abdome. O testículo é único, globular, rodeado por 7 voltas do espermiduto, às vezes 8.

As larvas são gemíparas com um blastozooide, e medem entre 1,0-1,5 mm de comprimento de tronco. A cauda faz $\frac{3}{4}$ de volta ao redor do tronco. As papilas adesivas possuem o pedúnculo longo e fino. No espécime de Curaçao (ZMA TU 157), a larva possuía 8 pares de ampolas alongadas, enquanto que no material do Brasil as larvas mostraram uma variação no número de ampolas ectodérmicas dentro da mesma colônia, as quais variavam entre 6 e 11 ampolas em cada lado.

Comentários. Monniot (1983) observou nos espécimes de Guadalupe 12 fendas por fileira faríngea e larva menor, com 1 mm de comprimento de tronco, citando uma variação no número de ampolas no espécime-tipo analisado por ela. O material ZMA TU 157, o qual foi reportado como *D. vanderhorsti* por Millar (1962), foi reanalisado e constatou-se que o espécime continha todas as características de *D. cineraceum*. As larvas eram gemíparas e com 1-1,2 mm de comprimento de tronco e 8 pares de ampolas ectodérmicas.

Distribuição Geográfica. Localidade tipo: Jamaica (Sluiter 1898; Goodbody 2003). Outras localidades: Guadalupe (Monniot 1983), Venezuela (Rocha *et al.* 2010), Brasil - Ceará, Bahia, São Paulo (Oliveira-Filho 2010; Rocha & Bonnet 2009), Serra Leoa (Monniot & Monniot 1994), Nova Caledônia (Monniot 1995).

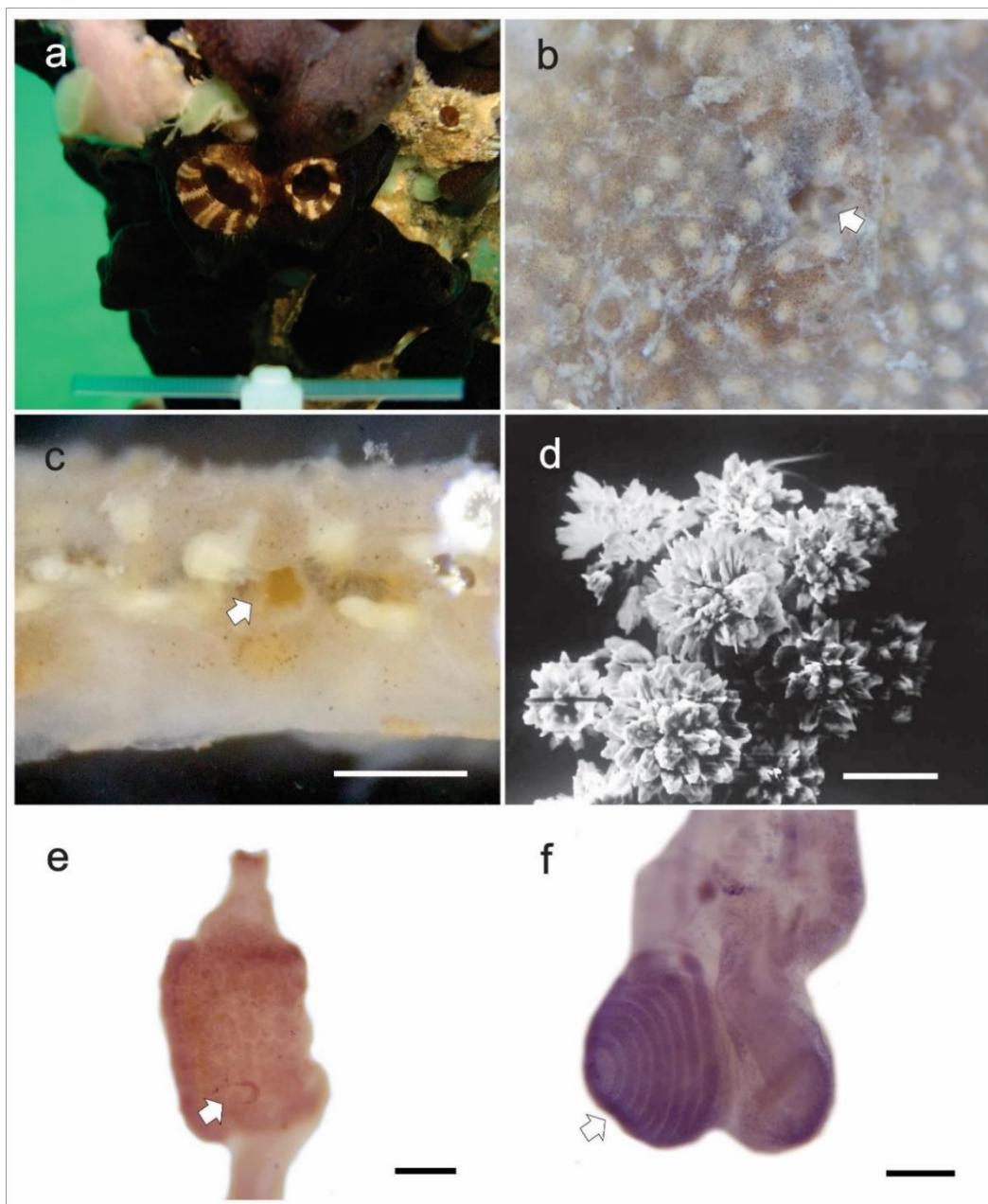


Figura 4. *Didemnum cineraceum* (Sluiter, 1898). **a**, Colônia *in situ* no Panamá recobrindo *Styela* sp. **b**, Detalhe da superfície da colônia preservada. Seta indica a abertura cloacal. **c**, Corte transversal da colônia. Seta indica a cavidade cloacal. **d**, Espículas - Espécime de São Paulo. **e**, Tórax (seta indicando o órgão torácico lateral). **f**, Abdome. A seta para o testículo globular rodeado pelas voltas do espermiduto (zooides corados com hematoxilina). Escalas: c = 0,5 mm; d = 15 μ m; e-f = 0,1 mm.

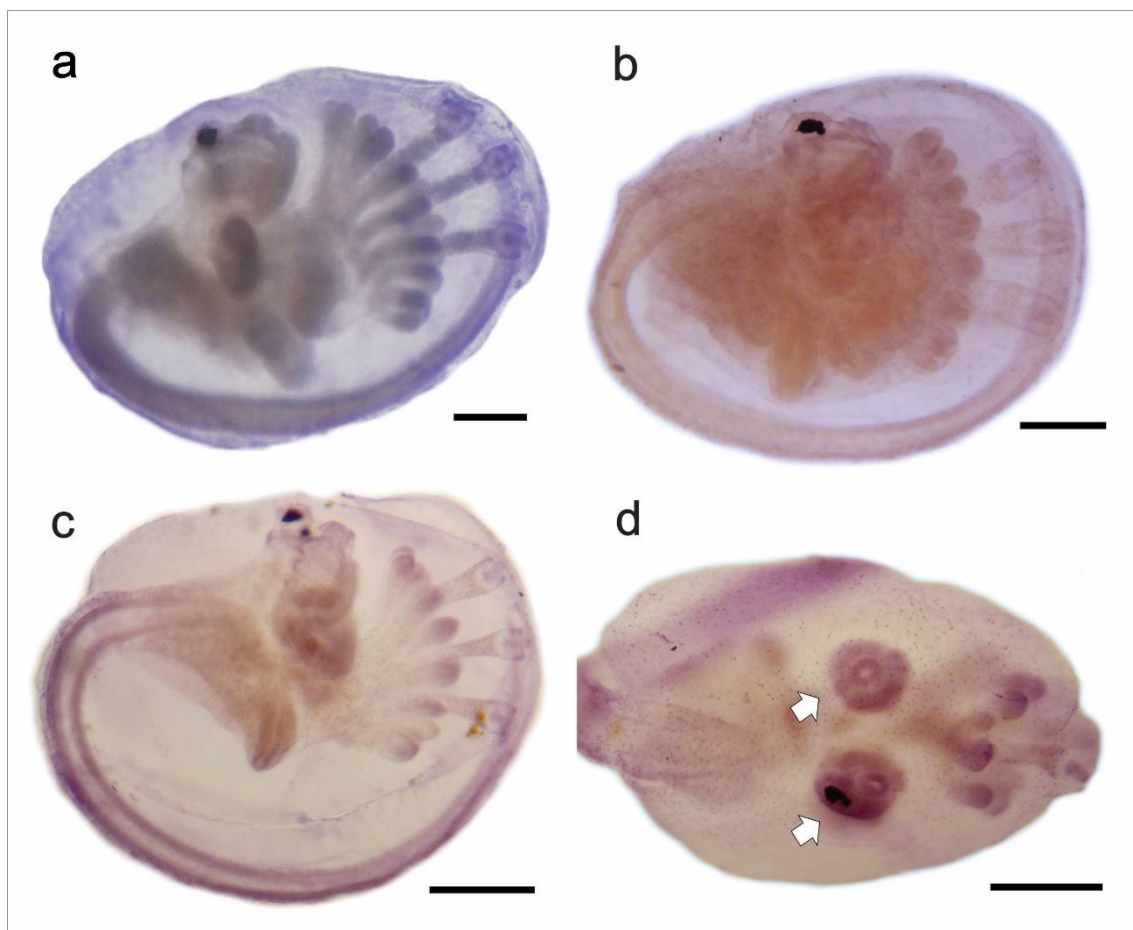


Figura 5. *Didemnum cineraceum* (Sluiter, 1898). Variação na morfologia de larvas encontradas nos espécimes analisados (larvas coradas com hematoxilina). **a**, Curaçao. **b**, Brasil. **c**, Panamá. **d**, Vista dorsal de uma larva mostrando que há dois embriões na região dorsal (setas). Escalas: 0,2 mm.

Didemnum sp.1 (possível *D. vanderhorsti* Van Name, 1924)

(figs. 6 e 7)

Material examinado. DZUP DID-585, Franklin Cove, Isla Santa Cruz, Galápagos, Equador (0°45'00" S, 90°19'00" W), 1 colônia, *leg.* Lambert, G. DZUP DID-757, Marina Bocas, Bocas del Toro, (9°20'8" N, 82°14'48" W), 1 colônia, 1- 3 m, 21/06/2014, *leg.* Rocha, R.M. AMNH 715 (sintipo), Spaansch Water, Curaçao, 1 colônia, 29/04/1920, *leg.* Van der Horst. DZUP DID-755, Porto Petrobrás, São Sebastião, São Paulo, Brasil (23°48'07" S, 45°23'27" W), 1 colônia, 4 m, 12/12/2009, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. As colônias apresentam uma coloração que varia do roxo escuro ao negro, medem cerca de 2-8 cm de diâmetro e 1-2 mm em espessura. As aberturas cloacais são amplas e com a borda lisa. A túnica é gelatinosa, translúcida, podendo os zooides serem vistos através da superfície da colônia. Os zooides não estão dispostos em sistemas. Em algumas colônias as espículas são ausentes, enquanto em outras estão presentes em baixa densidade, restritas à camada superficial da colônia. No espécime de Galápagos (DZUP DID-585), elas estão presentes, principalmente, nos lobos dos sifões orais dos zooides. Elas apresentam formato globular com 6-8 raios curtos e cônicos em uma seção transversal. Já no espécime do Panamá (DZUP DID-757), as espículas distribuem-se uniformemente na camada superficial da colônia.

Os zooides são incolores, medindo entre 0,7-1 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos e triangulares. A abertura atrial é pequena. Os órgãos torácicos laterais possuem formato de aba e são circulares, localizando-se na altura da 3ª fileira de fendas. O processo muscular é menor que o abdome, projetando-se na região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é curto. O abdome posiciona-se horizontalmente em relação ao tórax. A alça intestinal secundária sobrepõe-se ao estômago. O testículo só estava presente no material de Bocas del Toro (DZUP DID-757), porém a gônada não pode ser visualizada com clareza devido à degradação do material.

Larvas foram encontradas somente no material do Panamá. As larvas não são gemíparas e medem entre 0,4-0,5 mm de comprimento de tronco. A cauda perfaz um pouco menos do que $\frac{3}{4}$ de volta ao redor do tronco. As papilas adesivas são bem próximas

e possuem o pedúnculo curto e largo enquanto o cálice é grande e profundo. As larvas possuem quatro pares de ampolas alongadas com extremidade arredondada. A vesícula sensorial está localizada na região posterior da larva. O estatócito localiza-se anteriormente ao ocelo.

Comentários. As larvas presentes em *Didemnum* sp. 1 (DZUP DID-757 - Panamá) assemelham-se em tamanho e número de pares de ampolas com *D. calliginosum*. Entretanto, diferentemente de *D. calliginosum*, *Didemnum* sp.1 não possui o tecido glandular na região abdominal. Observou-se ainda que, além da presença da estrutura glandular, *D. calliginosum* e *Didemnum* sp.1 possuem o formato dos órgãos torácicos laterais e tamanho do processo muscular distintos.

Didemnum sp. 1 apresenta todas as características descritas para *D. vanderhorsti* por Van Name, 1924, porém como Van Name não descreveu larvas não é possível compará-las. A única larva descrita para *D. vanderhorsti* provém de material brasileiro (Rocha & Monniot 1995), região geográfica distinta daquela para a qual a espécie foi descrita. As larvas encontradas nos espécimes do Panamá apresentam as mesmas características daqueles espécimes reportados previamente para o Canal de São Sebastião (Rocha & Monniot 1995).

Distribuição Geográfica. Brasil (Millar 1958; Rocha *et al.* 2005; Rocha & Monniot 1995).

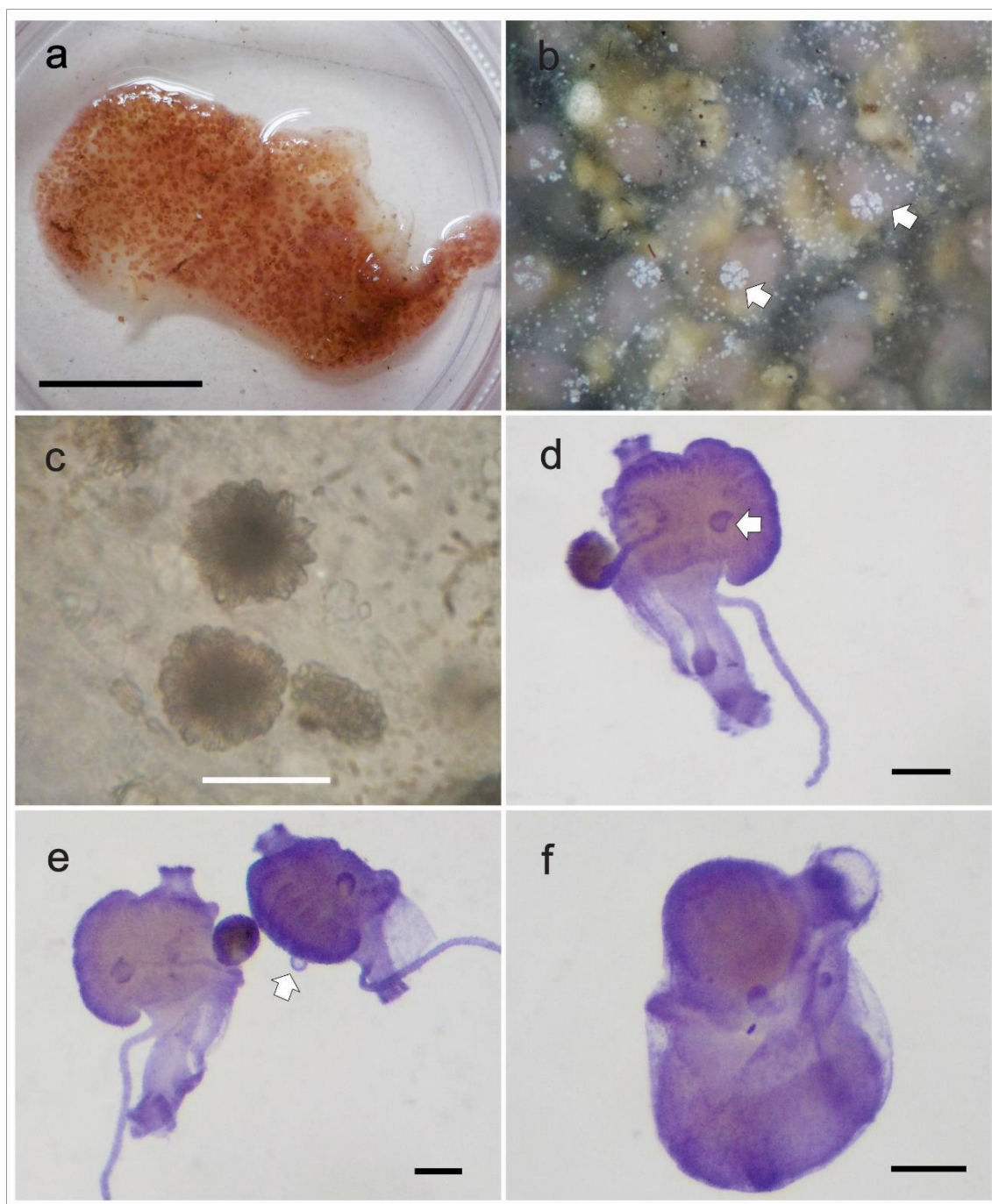


Figura 6. *Didemnum* sp.1 - Galápagos. **a**, Colônia preservada em formaldeído. **b**, Detalhe da superfície da colônia mostrando a distribuição das espículas. A seta indica os sifões orais. **c**, Espículas. **d**, Tórax (seta indicando o órgão torácico lateral). **e**, Tórax (seta indicando o órgão torácico lateral saliente e em formato de aba). **f**, Abdome (lado direito) (zooides e larvas coradas com hematoxilina). Escalas: c = 15 μ m; d-f = 0,1 mm.

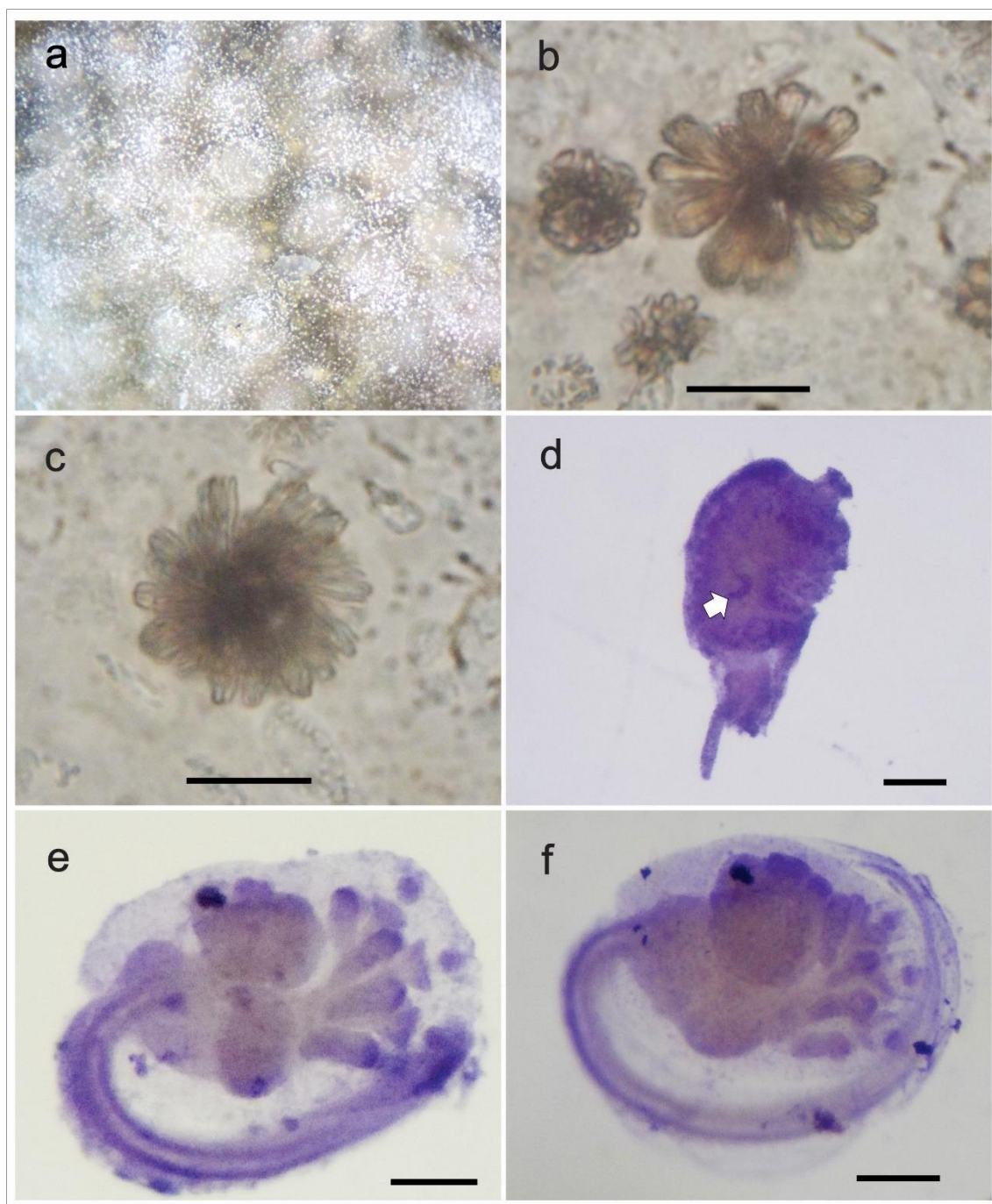


Figura 7. *Didemnum* sp.1 - Bocas del Toro, Panamá. **a**, Detalhe da superfície da colônia mostrando a distribuição das espículas. **b-c**, Espículas. **d**, Tórax (seta indicando o órgão torácico lateral). **e-f**, Larva (zooides e larvas coradas com hematoxilina). Escalas: b-c = 15 μ m; d-f = 0,1 mm.

Tabela 4. Comparação entre as descrições de *D. vanderhorsti* reportadas na literatura.

	Van Name 1924; 1945	Millar 1958	Rocha & Monniot 1995	Lotufo 2002
Localidade	Curaçao – localidade tipo	São Paulo, Brasil	São Paulo, Brasil	Pernambuco a Rio de Janeiro, Brasil
Colônia	Marrom chocolate ou castanha clara	Marrom chocolate ou castanha clara	Roxo escuro, marrom escuro ou marrom chocolate	Castanha, roxa escura ou marrom
Distribuição das espículas	Ausentes ou pouco abundantes	Ausentes	Sempre presentes em baixa densidade	Ausentes ou pouco abundantes
Formato das espículas	Globular com raios pouco desenvolvidos		Globular com numerosos raios curtos	Globular com raios curtos e imperfeitos
Diâmetro das espículas	10-15 µm	?	10-35 µm	15 µm
Zooides	1 mm	1.5 mm	1 mm	1 mm
Órgão torácico lateral	?	?	Grande e elíptico	Elíptico
Processo Muscular	< abdome	> abdome	< abdome	< abdome
Tecido glandular no abdome	?	?	?	?
Espermiduto	6-7 voltas	?	9 voltas	7-9 voltas
Tronco das larvas	?	?	0,5 mm	0,5 mm
Ampolas ectodérmicas	?	?	4 pares	4 pares

? – sem informação.

Didemnum sp. 2

(fig. 8)

Material examinado. SMNH 65, Golfo de Eilat, Israel (39°30'33,8" S, 34°55'28" W), 1 colônia, *leg.* Shenkar, N.

Caracterização. A colônia apresenta coloração negra com a pigmentação restrita basicamente à camada superficial da colônia, principalmente cada um dos zooides e nos lobos do sifão oral. Na amostra analisada (2 cm²) apenas foi observada uma abertura cloacal, a qual é ampla e ovalada. As espículas são pouco abundantes, distribuídas ao redor dos zooides. Elas medem de 10-30 µm de diâmetro, são globulares e possuem raios cônicos com extremidade rombuda e com ranhuras.

Os zooides se destacam na colônia por sua coloração. Eles possuem o tórax amarronzado e abdome branco. Medem cerca de 1 mm de comprimento. O sifão oral é longo com seis lobos arredondados. A abertura atrial é ampla e expõe toda a faringe. A faringe tem cerca de 12-10-8-8 fendas em cada fileira, respectivamente. Os órgãos torácicos laterais variam em tamanho e forma de acordo com a contração do zooide. Nos zooides mais relaxados, eles possuem formato de meia lua, não saliente, localizando-se na altura da 4ª fileira de fendas. O processo muscular é curto, projetando-se na região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é curto e largo. O abdome posiciona-se horizontalmente em relação ao tórax. A alça intestinal secundária sobrepõe-se ao estômago. O testículo é único, achatado, rodeado por 7 voltas do espermiduto. Não há larvas no material analisado.

Comentários. Este espécime não se assemelha a nenhum outro observado aqui neste trabalho. *Didemnum* sp. 2 possui o testículo achatado em oposição aos testículos observados nas demais espécies que possuem formato globular. Apesar do material ter sido fixado em álcool e ser muito pequeno algumas características da colônia ainda estavam preservadas.

Distribuição Geográfica. Golfo de Eilat (este estudo).

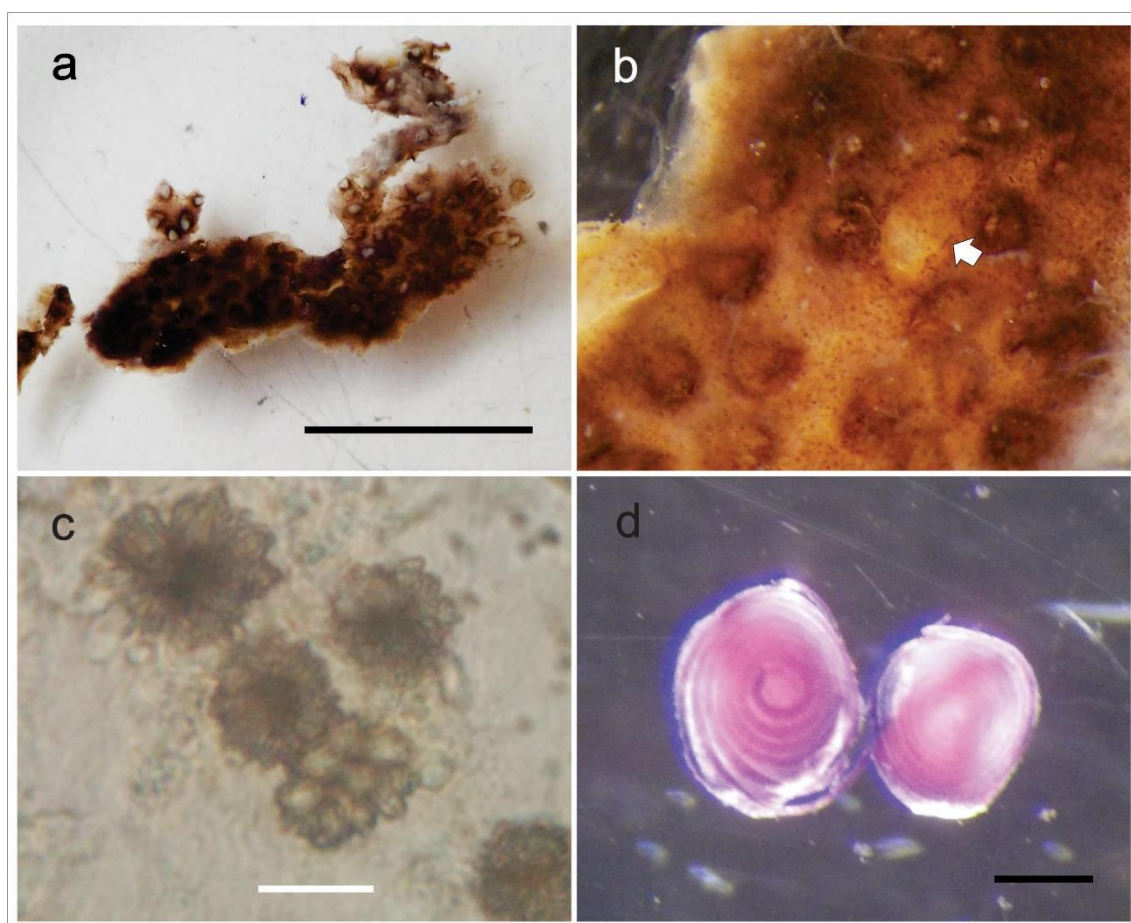


Figura 8. *Didemnum* sp. 2 – Eilat Israel. **a**, Colônia preservada em álcool. **b**, Detalhe da superfície da colônia mostrando a abertura cloacal comum (seta). **c**, Espículas. **d**, Dois testículos distintos com espermiduto em espiral. Escalas: a = 1 cm; c = 10 µm; d = 1 mm.

Didemnum sp. 3

(fig. 9)

Holótipo. DZUP DID-735, Ilha Comprida, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil (22°51'41" S, 41°56'12" W), 1 colônia, 13 m, 06/05/2014, *leg.* Skinner, L.F.

Parátipos. DZUP DID-731, Naufrágio, Guarapari, Espírito Santo, Brasil (20°41'23" S, 40°23'24" W), 1 colônia, 20 m, 26/01/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-736, Parcel da Coroa, Ilha Búzios, São Paulo (23°49'00" S, 45°09'00" W), 1 colônia, 0-0,5 m, 05/12/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-105, Saco do Capim, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil (27°17'08" S, 48°22'25" W), 1 colônia, lâminas DID 1.97, DID 1.100 e DID 3.05, 15/11/1998, *leg.* Rocha, R.M.

Material adicional. DZUP DID-729, Naufrágio Victory 8B, Guarapari, Espírito Santo, Brasil (20°41'23" S, 40°23'24" W), 1 colônia, 20 m, 26/01/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-730, Naufrágio Victory 8B, Guarapari, Espírito Santo, Brasil (20°41'23" S, 40°23'24" W), 1 colônia, 20 m, 26/01/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-732, Naufrágio Victory 8B, Guarapari, Espírito Santo, Brasil (20°41'23" S, 40°23'24" W), 1 colônia, 20 m, 26/01/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-754, Ilha Escalvada, Espírito Santo, Brasil (20°41'58" S, 40°24'27,82" W), 1 colônia, 27/01/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-733, Ilha Comprida, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil (22°51'41" S, 41°56'12" W), 1 colônia, 13 m, 06/05/2014, *leg.* Skinner, L.F. DZUP DID-734, Ilha dos Papagaios, Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil (22°53'55" S, 41°58'42" W), 1 colônia, 13 m, 09/05/2014, *leg.* Skinner, L.F. DZUP DID-743, Parcel da Coroa, Ilha Búzios, São Paulo (23°49'00" S, 45°09'00" W), 1 colônia, 0-0,5 m, 02/12/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-744, Parcel da Coroa, Ilha Búzios, São Paulo (23°49'00" S, 45°09'00" W), 1 colônia, 0-0,5 m, 01/12/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-748, Parcel da Coroa, Ilha Búzios, São Paulo (23°49'00" S, 45°09'00" W), 1 colônia, 0-0,5 m, 01/12/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-749, Parcel da Coroa, Ilha Búzios, São Paulo (23°49'00" S, 45°09'00" W), 1 colônia, 0-0,5 m, 01/12/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-750, Parcel da Coroa, Ilha Búzios, São Paulo (23°49'00" S, 45°09'00" W), 1 colônia, 0-0,5 m, 01/12/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-746, Parcel da Coroa, Ilha Búzios, São Paulo (23°49'00" S, 45°09'00" W), 1 colônia, 0-0,5 m, 01/12/2008, *leg.*

Kremer, L.P. DZUP DID-738, Parcel da Coroa, Ilha Búzios, São Paulo (23°49'00" S, 45°09'00" W), 1 colônia, 0-0,5 m, 01/12/2008, Kremer, L.P. DZUP DID-751 Ilha Serraria, São Sebastião, São Paulo, Brasil (23°48'54" S, 45°13'44" W), 1 colônia, 04/12/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-745, Naufrágio DART, Ilhabela, São Sebastião, São Paulo (23°55'04" S, 45°27'24" W), 1 colônia, 30/11/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-737, Naufrágio DART, Ilhabela, São Sebastião, São Paulo (23°55'04" S, 45°27'24" W), 1 colônia, 30/11/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-747, Naufrágio DART, Ilhabela, São Sebastião, São Paulo (23°55'04" S, 45°27'24" W), 1 colônia, 30/11/2008, *leg.* Kremer, L.P. DZUP DID-752 Ilha de Alcatrazes, São Sebastião, São Paulo (24°06'55,3" S, 45°42'20,6" W), 1 colônia, 18 m, 29/06/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-753 Ilha de Alcatrazes, São Sebastião, São Paulo (24°55'04" S, 45°27'24" W), 1 colônia, 8 m, 29/06/2012, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-742, Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil (27°17'08" S, 48°22'25" W), 1 colônia, 6 m, 19/04/2008, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-740, Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil (27°17'08" S, 48°22'25" W), 1 colônia, 6 m, 19/04/2008, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-741, Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil (27°17'08" S, 48°22'25" W), 1 colônia, 6 m, 19/04/2008, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-739, Naufrágio Granada, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil (27°17'08" S, 48°22'25" W), 1 colônia, 6 m, 19/04/2008, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-3.01 (lâmina), Saco do Capim, Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil (27°17'08" S, 48°22'25" W), 12/11/1998, *leg.* Rocha, R.M.

Descrição. As colônias apresentam coloração roxa escura ou negra e geralmente possuem várias aberturas cloacais circulares amplas com a borda lisa e coloração mais clara que a da túnica. Crescem sobre algas calcárias incrustantes, cirripédios ou envolvendo algas filamentosas e medem de 2,5 a 4 cm de diâmetro por 1 mm de espessura. A túnica é gelatinosa, translúcida, podendo os zooides serem vistos através da superfície da colônia. Os zooides não estão dispostos em sistemas. As espículas estão presentes em baixa densidade em toda a colônia, porém em algumas colônias, estão concentradas ao redor dos sifões orais. Elas são globulares e medem de 13 a 30 µm, podendo chegar a 70 µm. Os espécimes de Santa Catarina possuem espículas pequenas variando de 13-21 µm, com formatos variados: com raios rombudos, cônicos, algumas com várias pontas em cada raio correspondentes às agulhas que formam o raio. Nas

demais localidades, apresentam raios curtos, cônicos e estriados, geralmente 10-12 raios em uma secção transversal.

Os zooides são incolores, medem entre 1-1,2 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos e triangulares. A abertura atrial é pequena e quase não expõe as fendas faríngeas da região mediana do tórax. A faringe tem 8-8-8-7 fendas em cada fileira, respectivamente. Os órgãos torácicos laterais variam em tamanho e forma de acordo com a contração do zooide. Geralmente, localizam-se na altura da 3ª fileira de fendas e possuem formato de aba, muitas vezes alongado, apresentando o mesmo tamanho da fenda faríngea. Outras vezes, são circulares e salientes. O processo muscular é tão longo quanto o abdome, projetando-se na região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é longo e fino. O abdome posiciona-se horizontalmente em relação ao tórax. A alça intestinal secundária sobrepõe-se ao estômago. Tecido glandular está presente no abdome. O testículo é único, globular e pequeno, medindo 0,3 mm de diâmetro, rodeado geralmente por 6-7 voltas do espermiduto.

As larvas não são gemíparas e medem de 1,0 a 1,2 mm de comprimento de tronco. A cauda descreve $\frac{3}{4}$ de volta ao redor do tronco com largura variando entre 118 a 250 μm . As papilas adesivas são próximas entre si e possuem o pedúnculo fino com o mesmo comprimento da ampola. O diâmetro do cálice de cada papila adesiva pode variar de 114 a 118 μm . Elas possuem quatro pares de ampolas ectodérmicas longas (210-250 μm) bem separadas entre si e com extremidade arredondada. A vesícula sensorial (estatocito e ocelo) está presente na região posterior da larva. O ocelo está localizado acima do estatocito. O ocelo possui de 47 a 48 μm de comprimento e a distância entre ele e a região posterior da larva (tronco) pode ser de 285 a 333 μm . A faringe do oozoide possui de 7 a 8 fendas em cada fileira.

Comentários. *Didemnum* sp.3 foi identificada como *D. vanderhorsti* na região de Alcatrazes e em Arvoredo, principalmente pela semelhança na coloração da colônia e número de pares de ampolas na larva em ambas as espécies. No entanto, em Arvoredo, tanto *Didemnum* sp.3 quanto *Didemnum* sp.4 foram encontradas em simpatria. *Didemnum* sp.4 não pode ser a espécie aqui descrita, pois apresenta espículas estreladas com raios cônicos e pontiagudos e larva medindo entre 0,5-0,6 mm de comprimento de tronco. *Didemnum* sp.3 diferencia-se das demais espécies descritas neste estudo pelo grande tamanho larval, apesar de não gemípara e com apenas 4 pares de ampolas. Mesmo na

ausência de larvas, também pode ser facilmente diferenciada de *D. cineraceum* porque esta espécie apresenta pequeno órgão torácico lateral em formato de aba e ausência de tecido glandular abdominal; de *D. calliginosum* pelo órgão torácico lateral ovalado, pequeno e não saliente nesta última.

Distribuição Geográfica. Brasil: Espírito Santo à Santa Catarina.

Didemnum sp. 4

(Fig. 10)

Material examinado. DZUP DID-337, Naufrágio Victory 8B, Guarapari, Espírito Santo (20°41'23" S, 40°23'24" W), 2 colônias, 20 m, 12/02/2011, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-338, Ilha Escalvada, Guarapari, Espírito Santo (20°42'00" S, 40°24'30" W), 1 colônia, 12 m, 12/02/2011, *leg.* Gamba, G.A. DZUP DID-339, Naufrágio Victory 8B, Guarapari, Espírito Santo (20°41'23" S, 40°23'24" W), 4 colônias, 20 m, 26/01/2012, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-1.54, Praia do Baleeiro, São Paulo, 04/11/1991, 1 lâmina, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-1.56, Praia do Araçá, São Paulo, 17/01/1985, 1 lâmina, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-1.59, Praia do Baleeiro, São Paulo, 28/01/1991, 1 lâmina, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-1.62, Praia do Baleeiro, São Paulo, 10/08/1991, 1 lâmina, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-1.96, Saco do Capim, Santa Catarina, 14/11/1998, 1 lâmina, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-3.04, Saco do Capim, Santa Catarina, 12/11/1998, 1 lâmina, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. As colônias apresentam uma coloração que varia do roxo escuro ao negro, tornando marrom claro após a fixação. Medem aproximadamente de 6-10 cm de diâmetro e 1-2 mm de espessura. A túnica é gelatinosa, lisa e translúcida, podendo os zooides serem vistos através da superfície da colônia. As espículas são pouco abundantes, praticamente restritas à superfície da colônia. Porém, em algumas colônias, os lobos dos sífões orais possuem maior densidade de espículas. Elas são estreladas com 7-8 raios

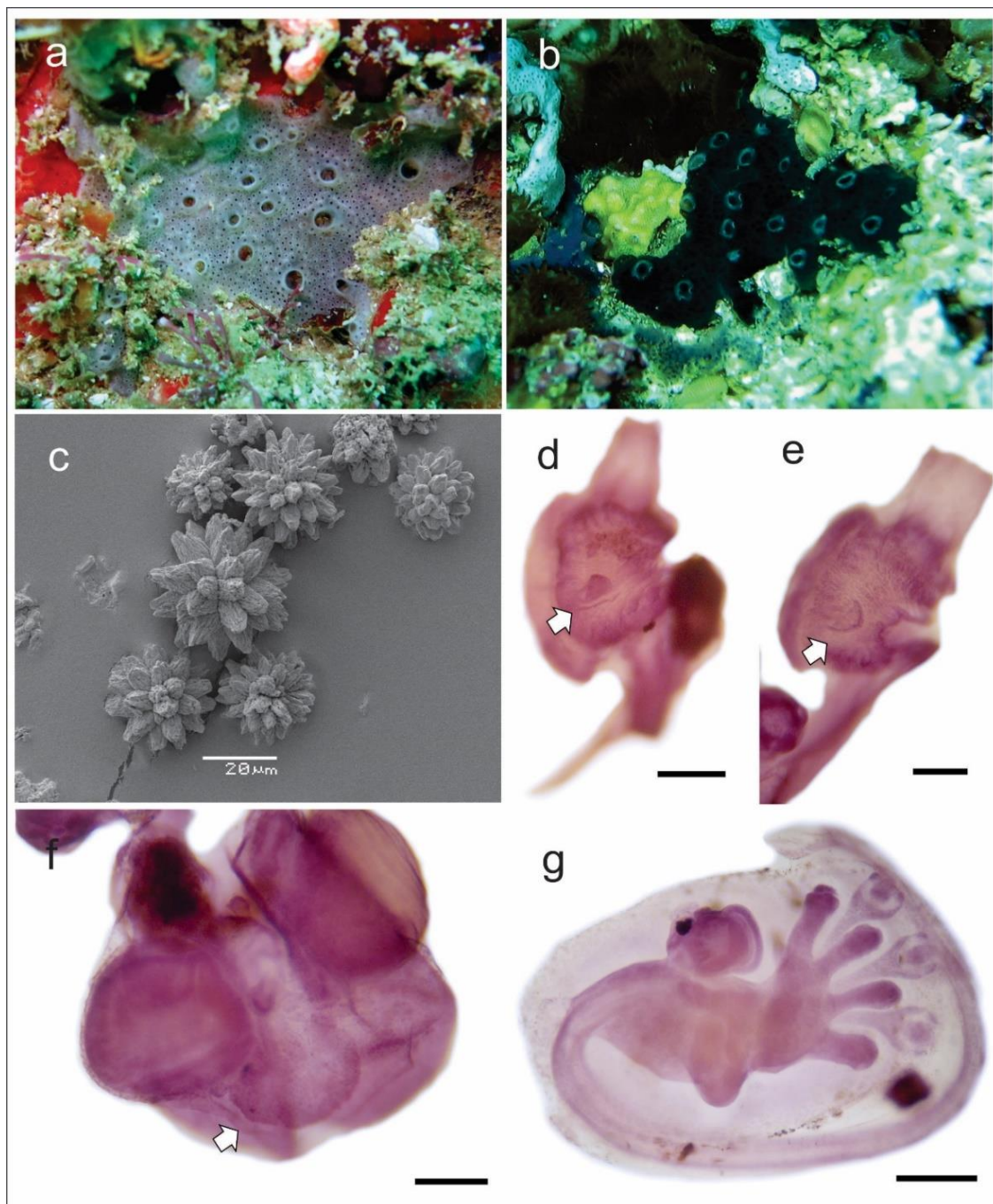


Figura 9. *Didemnum* sp. 3 **a-b**, Colônia *in situ* no Rio de Janeiro e em Santa Catarina, respectivamente. **c**, Espículas - Espécime DZUP DID-735 do Rio de Janeiro. **d-e**, Tórax. A seta indica a variação no formato e tamanho do órgão torácico lateral em função da contração do zooide. **f**, Abdome. A seta indica o tecido glandular que está presente no lado direito do animal. **g**, Larva - lâmina DZUP DID-3.01 (zooídes e larva corados com Hematoxilina). Escalas: d-f = 0,1 mm; g = 0,2 mm. Foto a: L.F. Skinner.

cônicos, longos e pontiagudos em secção transversal, com aproximadamente 30-50 μm de diâmetro.

Os zooides medem entre 1-1,7 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos e arredondados. A abertura atrial é ampla. A faringe tem 8-10 fendas em cada fileira. O órgão torácico é arredondado, localiza-se entre a 3^a-4^a fileira de fendas. O processo muscular é mais longo que o abdome, projetando-se na região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é longo e fino. A alça intestinal sobrepõe-se ao estômago. O testículo é único e globular, rodeado por 8-9 voltas do espermiduto.

As larvas não são gemíparas, arredondadas, medindo de 0,5-0,6 mm de comprimento de tronco. A cauda descreve $\frac{3}{4}$ de volta ao redor do tronco. Elas possuem quatro pares de ampolas ectodérmicas alongadas com extremidade arredondada. As três papilas adesivas apresentam pedúnculo curto e estão bastante próximas entre si. A vesícula sensorial (estatocito e ocelo) está presente na região central-posterior da larva. O ocelo está localizado diretamente sobre estatocito. A faringe do blastozooide possui três fileiras de fendas com 7 a 9 fendas faríngeas em cada fileira.

Comentários. A principal característica que distingue esta espécie das demais descritas neste estudo é a presença de espículas estreladas com raios cônicos e tamanho até 50 μm , sendo que as demais espécies apresentam espículas globulares geralmente menores que 30 μm com raios cilíndricos e rombudos.

Distribuição Geográfica. **Brasil:** Espírito Santo à Santa Catarina.

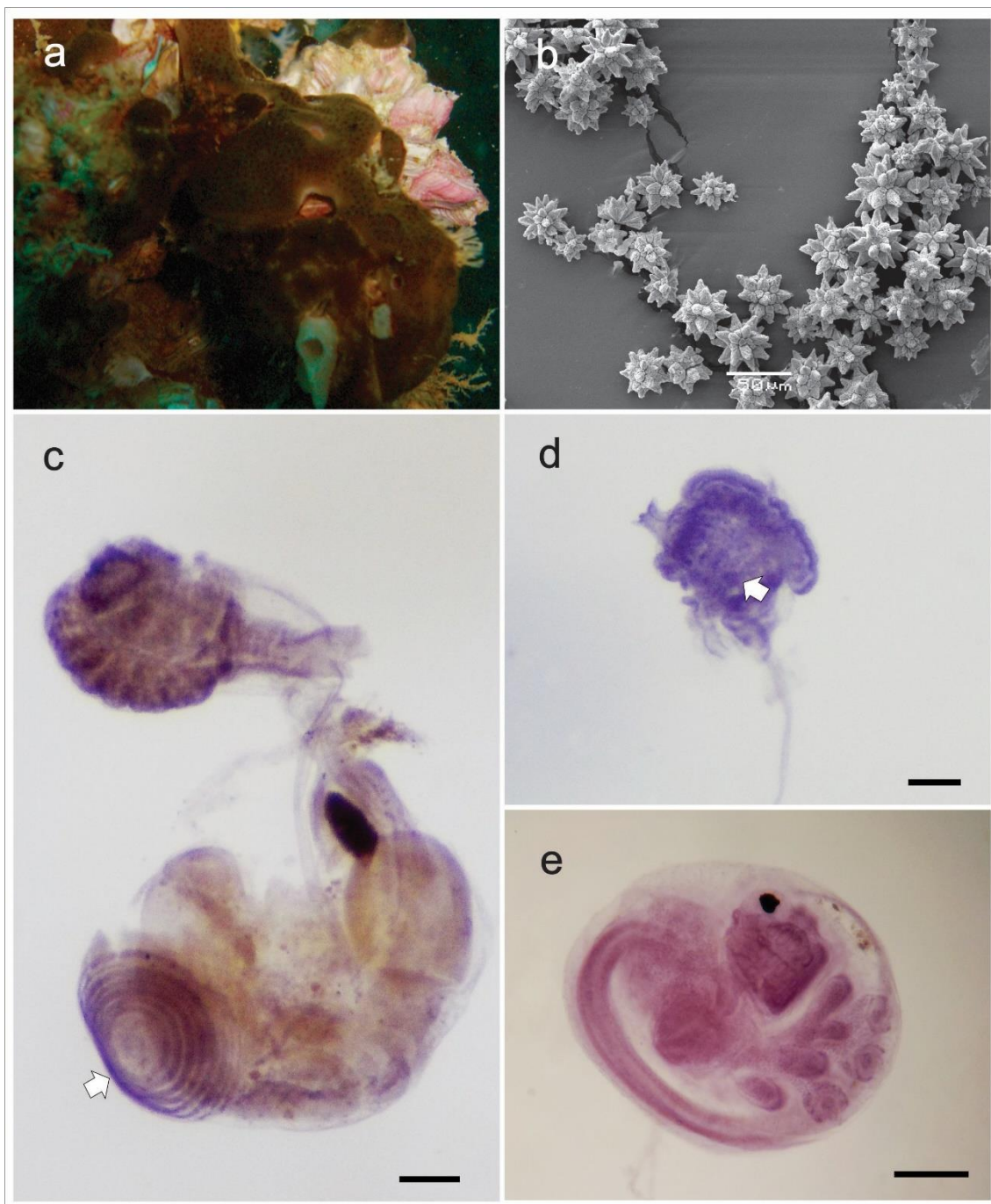


Figura 10. *Didemnum* sp. 4 - Brasil. **a**, Colônia *in situ* no Espírito Santo. **b**, Espículas. **c**, Zooide. A seta indicando o testículo achatado rodeado pelas voltas do espermiduto. **d**, Tórax (seta indicando o órgão torácico lateral). **e**, Larva (zooide e larva corados com Hematoxilina). Escalas: c-e = 0,1 mm.

Tabela 5. Comparação entre as espécies de *Didemnum* com túnica pigmentada e ausência ou baixa densidade de espículas em toda a colônia.

	<i>D. calliginosum</i> (Caribe)	<i>D. cineraceum</i> (Caribe e Brasil)	<i>Didemnum</i> sp. 1 (Galápagos)	<i>Didemnum</i> sp.1 (Panamá)	<i>Didemnum</i> sp.2 (Golfo de Eilat)	<i>Didemnum</i> sp.3 (Brasil)	<i>Didemnum</i> sp.4 (Brasil)
Colônia	Marrom ao negro	Marrom ou cinza escuro ao negro	Marrom	Roxo ou cinza escuro ao negro	Marrom escuro	Roxo ou cinza escuro ao negro com um halo claro nas cloacas	Marrom escuro
Distribuição das espículas	Ausentes ou pouco abundantes	Ausentes ou restritas ao redor dos sífões orais	Restritas ao redor dos sífões orais	Ausentes ou em algumas regiões da colônia	Restritas ao redor dos zooides	Em toda a colônia	Pouco abundantes
Espículas: número de raios em seção transversal	10-12	8-10	6-8	6-8	8-10	10-12	7-8
Forma dos raios das espículas	Cilíndricos com ranhuras e pontas arredondadas	Cônicos com ranhuras e extremidades subdivididas ou irregulares	Cilíndricos e curtos com ranhuras	Cilíndricos e curtos com ranhuras	Cônicos e curtos com ranhuras	Cônicos e curtos com ranhuras	Cônicos, longos e pontiagudos
Diâmetro das espículas	10-20 µm	13-30 µm	10-20 µm	10-35 µm	10-30 µm	10-30 µm, podendo chegar a 70 µm	30-50 µm
Zooides	1 mm	1-1,5 mm	0,8-1 mm	0,7-1 mm	1 mm	1-1,2 mm	1-1,7 mm
Órgão torácico lateral	Circular, 3ª fileira de fendas	Aba, 4ª fileira de fendas	Aba, 3ª fileira de fendas	Meia lua, 3ª fileira de fendas	Meia lua, 4ª fileira de fendas	Aba e alongado, entre a 3ª e 4ª fileiras de fendas	Circular, 3ª ou 4ª fileira de fendas

Tabela 5. Continuação.

	<i>D. calliginosum</i> (Caribe)	<i>D. cineraceum</i> (Caribe e Brasil)	<i>Didemnum</i> sp. 1 (Galápagos)	<i>Didemnum</i> sp.1 (Panamá)	<i>Didemnum</i> sp.2 (Golfo de Eilat)	<i>Didemnum</i> sp.3 (Brasil)	<i>Didemnum</i> sp.4 (Brasil)
Glândula no abdomen	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
Testículo	Globular	Globular	Globular	Globular	Achatado	Globular	Globular
Espermiduto	6-7 voltas	7-8 voltas	?	?	7 voltas	7 voltas	8-9 voltas
Larvas - tronco	0,5-0,6 mm	1-1,5 mm	?	0,4 - 0,5 mm	?	1-1,2 mm	0,5 - 0,6 mm
Ampolas ectodérmicas	4 pares	6 – 11 ampolas	?	4 pares	?	4 pares	4 pares
Nº blastozoides na larva	0	1	?	0	?	0	0

Discussão

Baseado nos resultados apresentados acima, nosso estudo revelou que o código de barras genético foi fundamental na elucidação da taxonomia em *Didemnum*, cujas espécies apresentam sobreposição significativa de alguns caracteres diagnósticos tradicionais (Tabela 5), sugerindo um cenário com um complexo de espécies que compreende, pelo menos, cinco táxons distintos com alto suporte de bootstrap ($> 70\%$) e probabilidade posterior > 0.99 . As análises filogenéticas também revelaram-se úteis na elucidação de especiação críptica (Pérez-Portela *et al.* 2013), as quais nortearam a re-avaliação de caracteres morfológicos que também mostraram diferenciação suficiente para separar as espécies. Entretanto, nem sempre as estruturas morfológicas necessárias para se determinar uma espécie estão presentes, pois a maior parte destes caracteres refere-se a gônadas e larvas que só estão presentes no período reprodutivo das espécies. Assim, outros métodos devem ser utilizados para validar uma espécie (Firkowski *et al.* 2016; Razkin *et al.* 2017).

Apesar de utilizarmos um número limitado de espécimes, os clados estão bem definidos, com dois deles necessitando de uma atenção especial, *Didemnum* sp.1 e *Didemnum* sp.3, pois ambos os clados possuem uma alta divergência intraespecífica ($>2,6\%$), revelando a possível existência de mais de uma espécie em cada clado e que não puderam ser definidas. Este valor é relativamente baixo quando o comparamos com a divergência interespecífica encontrada em outros grupos de ascídias coloniais como *Botryllus* (10-16,5%), *Clavelina* (15-20%), *Diplosoma* (17-20%) e *Pycnoclavela* (10-21%) (Bock *et al.* 2012; Pérez-Portela *et al.* 2013; Pérez-Portela & Turon 2008), entretanto, estes valores não podem ser diretamente aplicados para os grupos de espécies de *Didemnum* abordados aqui neste estudo em que divergência interespecífica encontrada variou de 2,4 a 15,6%.

Nas análises moleculares, só foram utilizados espécimes brasileiros de *D. cineraceum*, todavia, tanto os espécimes coletados no Brasil quanto aqueles do Caribe foram analisados morfolologicamente e todos apresentaram características de acordo com a descrição de Monniot (1983). Este clado contém espécimes com ausência de espículas na túnica ou, quando presentes, as espículas encontram-se restritas à camada superficial da colônia, especificamente concentradas nos lobos dos sífões orais. As larvas são gemíparas com 1-1,2 mm de comprimento de tronco e apresentam de 6 a 11 pares de ampolas. Variação no número de ampolas também foi observada por Monniot (1983), a qual analisou as larvas do espécime tipo constatando uma variação de 6 a 8 ampolas em cada lado. A autora também notou uma variação na densidade de espículas nos espécimes de Guadalupe e uma pequena diferença no número de

fendas em cada fileira faríngea no adulto em relação ao espécime-tipo. A área de origem da espécie não está bem definida, mas existem indícios de possível introdução na costa (Oliveira-Filho 2010; Rocha & Bonnet 2009), Serra Leoa (Monniot & Monniot 1994) e Nova Caledônia (Monniot 2007). Na localidade tipo, Guadalupe, ocorre apenas em profundidades inferiores a 10 m sobre raízes de mangue e sob corais mortos, mas também em dois piers (Monniot 1983). Já no Brasil, os espécimes aqui analisados foram coletados em duas regiões com intenso tráfego de barcos, das quais uma encontra-se no Nordeste e outra no Sudeste do país.

O clado *Didemnum* sp.1 (possível *D. vanderhorsti*) é formado por dois subgrupos: espécimes do Atlântico (Panamá e Brasil) e espécime de Galápagos. A análise BPTP e a distância genética entre os subgrupos Pacífico e Atlântico (0,039) indicam que ambos podem ser espécies distintas, todavia, não há evidências morfológicas suficientes para separar o espécime de Galápagos dos espécimes do Atlântico pois o mesmo não se encontrava com gônadas ou larvas e nem número de espécimes suficientes para observar a variação existente dentro de cada espécie.

Didemnum vanderhorsti originalmente foi descrita para Curaçao por Van Name (1924), posteriormente diversos outros registros foram feitos para a região caribenha (Goodbody 1984; Millar 1962; Van Name 1945), porém nenhuma outra descrição morfológica mais detalhada foi publicada para esta espécie, exceto em Van Name (1945) que apenas cita poucas diferenças nos espécimes da Flórida em relação ao espécime tipo. Millar (1962) reportou *D. vanderhorsti* para Joris baai em Curaçao. O espécime reportado por ele (ZMA TU 157) foi revisto e as larvas encontradas indicam que este exemplar se trata de *D. cineraceum* (fig. 5a). Assim, uma vez que nas descrições de Van Name não há nenhuma menção sobre a larva ou sobre a forma e posicionamento do órgão torácico lateral, surgiu a dúvida se o espécime descrito por Van Name (1924) se trata realmente de *D. vanderhorsti* e ambas espécies co-ocorrem nesta ilha ou se Van Name cometeu um erro redescrivendo *D. cineraceum* com o nome *D. vanderhorsti*, que seria então um sinônimo júnior de *D. cineraceum*. A descrição de Van Name (1945) menciona ainda espermiduto com 6-7 voltas, que também é característica de *D. cineraceum*. As espículas não estavam presentes na túnica do exemplar de Millar (1962) revisto e o mesmo possuía uma túnica de aspecto gelatinoso como foi mencionado para *D. cineraceum* por Monniot (1995). Assim, baseado na ausência de algumas estruturas na descrição do espécime-tipo, características observadas na amostra coletada em Curaçao, bem como na variação encontrada nas diversas descrições encontradas na literatura (Tabela 3) preferiu-se denominar este clado como

Didemnum sp.1 até que o exemplar tipo de *D. vanderhorsti* possa ser revisto e sua validade confirmada.

No Brasil, Millar (1958) reportou *D. vanderhorsti*, pela primeira vez, para São Sebastião. Algumas décadas depois, Rocha & Monniot (1995) descreveram a larva de *D. vanderhorsti*, a partir de espécimes coletados no Atlântico Sul - São Sebastião em São Paulo. As lâminas desses espécimes (Rocha & Monniot 1995) também foram re-analisadas, observando-se o testículo com 9 voltas do espermiduto e espículas estreladas, características estas distintas daquelas encontradas na descrição de Van Name (1924) para *D. vanderhorsti* (Tabela 3). O espécime do Porto Petrobrás (São Paulo) não possui espículas na túnica e nem gônadas desenvolvidas, bem como ausência do tecido glandular no abdome. Apenas foram encontradas larvas, as quais se assemelham com aquelas descritas por Rocha & Monniot (1995). Desta forma, chegou-se à conclusão de que os espécimes inicialmente identificados como *D. vanderhorsti* para a costa sudeste e sul do Brasil, na verdade, representam três espécies distintas, *Didemnum* sp.1, *Didemnum* sp.3 e *Didemnum* sp.4. Todas as diferenças encontradas entre as espécies estão resumidas na Tabela 5.

Os clados que suportam as espécies *D. calliginosum* e *Didemnum* sp.2 também estão bem definidos. *D. calliginosum* é conhecida apenas pelo espécime tipo descrito para a região de Guadalupe (Monniot 1983) e, após este estudo, para a região de Bocas del Toro, Panamá. A análise morfológica de *Didemnum* sp. 2 revelou que esta espécie apresenta algumas diferenças importantes em relação às demais espécies, como maior densidade de pigmentação na túnica, órgão torácico em formato de meia lua e principalmente o testículo achatado, que indicam que este espécime deveria ser descrito como uma nova espécie. No entanto, para descrever esta espécie adequadamente será necessário coletar mais exemplares com larvas maduras. Tanto a análise morfológica quanto a análise molecular indicaram que 22 espécimes da costa sudeste/sul brasileira (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina) representam uma nova espécie, a qual está descrita aqui. Embora a análise de ABGD tenha mostrado que podem existir duas espécies dentro deste clado, a distância genética entre o espécime da Ilha de Búzios-SP (UPDID0004-17) e o espécime mais próximo (UPDID0012-17) do Espírito Santo é bem pequena (2,4%), quando comparada com a distância genética média interespecífica aqui encontrada, a qual é de 12,7% e a intraespecífica de 1%. (Tabela 1). Além do mais, a precisão dessa análise para identificar as espécies depende do número de espécimes incluídos, assim um único haplótipo não é suficientemente informativo para separá-las. Um outro fator que deve ser abordado é que, apesar dos espécimes estarem dentro da mesma região biogeográfica, os

comprimentos dos ramos curtos e os valores de bootstrap baixos refletem que as relações são instáveis dentro do grupo. Isto pode ser resultante da utilização de apenas um marcador molecular.

Este estudo mostrou que em ambos os registros *D. calliginosum* foi reportada em regiões de marinas no Mar do Caribe (Monniot 1984; Neves 2015); *D. cineraceum* foi a espécie que apresentou maior amplitude geográfica sendo encontrada em regiões de marinas e áreas portuárias no Brasil (Dias *et al.* 2013; Oliveira-Filho 2010; Rocha *et al.* 2011), enquanto que em Guadalupe ela foi encontrada em ambos os substratos. Já em Nova Caledônia, *D. cineraceum* foi encontrada em vários pontos de uma lagoa e na barreira de recife entre 10 e 40 m de profundidade. Em Serra Leoa, o substrato não foi especificado, apenas a profundidade a qual foi de 3 m (Monniot & Monniot 1994). Para esclarecer a verdadeira identidade de *D. vanderhorsti*, se faz necessário re-examinar o espécime-tipo ou realizar um inventário das espécies de didemnídeos escuros com baixa densidade de espículas em Curaçao para verificar se ocorrem outras espécies além de *D. cineraceum*. No Brasil, há três espécies bastante similares formando um complexo de espécies: *Didemnum* sp. 1, *Didemnum* sp.3 e *Didemnum* sp.4, sendo que a primeira foi encontrada apenas em um porto no estado de São Paulo e as duas últimas encontradas desde o estado do Espírito Santo a Santa Catarina, colonizando substratos naturais e artificiais com profundidade acima de 6 m.

Referências

- Cruz-Barraza, J.A., Carballo, J.L., Rocha-Olivares, A., Ehrlich, H. & Hog, M. (2012) Integrative taxonomy and molecular phylogeny of genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. *PLoS ONE* 7.
- Dias, G.M., Rocha, R.M., Lotufo, T.M.C. & Kremer, L.P. (2013) Fifty years of ascidian biodiversity research in São Sebastião, Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 273–282.
- Firkowski, C.R., Bornschein, M.R., Ribeiro, L.F. & Pie, M.R. (2016) Species delimitation, phylogeny and evolutionary demography of co-distributed, montane frogs in the southern Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 100, 345–360.
- Goodbody, I. (1984) Ascidians from Caribbean shallow water localities. *Studies on the fauna of Curaçao and other caribbean islands* 203, 62–76.
- Goodbody, I. (2003) The ascidian fauna of Port Royal, Jamaica I. Harbor and mangrove dwelling species. *Bulletin of Marine Science* 73, 457–476.
- Gutiérrez-Valencia, J., Gutiérrez, Y. & G. Dias, L. (2017) Species delimitation in the crypsis-defended and polymorphic stick insects of the genus *Libethra* (Phasmatodea, Diapheromeridae). *Zoologica Scripta* 46, 693–705.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Heethoff, M., Laumann, M., Weigmann, G. & Raspotnig, G. (2011) Integrative taxonomy: Combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Frontiers in Zoology* 8, 2.
- Hess, J.E., Swalla, B.J. & Moran, P. (2009) New molecular markers to genetically differentiate populations of *Didemnum vexillum* (Kott, 2002) - an invasive ascidian species. *Aquatic Invasions* 4, 299–310.
- Hirose, M. & Hirose, E. (2009) DNA barcoding in photosymbiotic species of *Diplosoma* (Asciacea: Didemnidae), with the description of a new species from the southern Ryukyus, Japan. *Zoological Science* 26, 564–568.

- Hirose, M., Nozawa, Y. & Hirose, E. (2010) Genetic isolation among morphotypes in the photosymbiotic didemnid *Didemnum molle* (Ascidacea, Tunicata) from the Ryukyus and Taiwan. *Zoological science* 27, 959–964.
- Hirose, M., Yokobori, S. & Hirose, E. (2009) Potential speciation of morphotypes in the photosymbiotic ascidian *Didemnum molle* in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Coral Reefs* 28, 119–126.
- Kott, P. (1962) The ascidians of Australia. III. Aplousobranchiata Lahille: Didemnidae Giard. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 13, 265–334.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution* 33, 1870–1874.
- Lotufo, T.M.C. (2002) Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Lotufo, T.M.C. & Silva, A.M.B. (2006) Biota Marinha da costa oeste do Ceará. In: H. M. Cascon and T. M. C. Lotufo (Eds), *MMA, Probio*. Fortaleza, pp. 248.
- Millar, R.H. (1958) Some ascidians from Brazil. *Annals and Magazine of Natural History* 1, 497–514.
- Millar, R.H. (1962) Some ascidians from the Caribbean. *Studies on the fauna of Curaçao and other caribbean islands* 13, 61–77.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*.
- Monniot, C. & Monniot, F. (1994) Additions to the inventory of Eastern Tropical Atlantic ascidians; arrival of cosmopolitan species. *Bulletin of Marine Science* 54, 71–93.
- Monniot, F. (1983) Ascidiées littorales de Guadeloupe I. Didemnidae. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris* 5A, 5–49.
- Monniot, F. (1984) Ascidiées littorales de Guadeloupe VIII. Questions de systématique évolutive posées par les Didemnidae. *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris* 6A, 885–905.
- Monniot, F. (1995) Ascidiées de Nouvelle-Calédonie XV. Le genre *Didemnum*. *Bulletin du*

Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris 16A, 299–344.

- Monniot, F. (2007) Some comments on the Ascidians of New Caledonia. In: C. E. Payri and B. Richer de Forges (Eds), *Compendium of marine species of New Caledonia*. IRD Nouméa, pp. 349–356.
- Oliveira-Filho, R.R. (2010) Caracterização das ascídias em regiões portuárias do Ceará. *Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza*, 111.
- Padula, V., Araujo, A. K., Matthews-Cascon, H. & Schrod, M. (2014) Is the Mediterranean Nudibranch *Cratena Peregrina* (Gmelin, 1791) present on the Brazilian Coast? Integrative species delimitation and description of *Cratena minor* n. sp. *Journal of Molluscan Studies*, 1–10.
- Pérez-Portela, R. & Turon, X. (2008) Phylogenetic relationships of the Clavelinidae and Pycnoclavellidae (Ascidacea) inferred from mtDNA data. *Invertebrate Biology* 127, 108–120.
- Pérez-Portela, R., Arranz, V., Rius, M. & Turon, X. (2013) Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. *Scientific reports* 3, 1–10.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. & Achaz, G. (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21, 1864–1877.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. (2013) A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE* 8.
- Razkin, O., Gómez-Moliner, B.J., Vardinoyannis, K., Martínez-Ortí, A. & Madeira, M.J. (2017) Species delimitation for cryptic species complexes: case study of *Pyramidula* (Gastropoda, Pulmonata). *Zoologica Scripta* 46, 55–72.
- Rocha, R.M. & Bonnet, N.Y.K. (2009) Ascídias (Tunicata, Ascidacea) introduzidas no Arquipélago de Alcatrazes, São Paulo. *Iheringia* 99, 27–35.
- Rocha, R.M. & Monniot, F. (1995) Taxonomic and ecological notes on some *Didemnum* species (ascidiacea, didemnidae) from São Sebastião Channel, South-Eastern Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 55, 639–649.
- Rocha, R.M., Dias, G.M. & Lotufo, T.M.C. (2011) Checklist das ascídias (Tunicata,

- Ascidiacea) do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 11, 749–759.
- Rocha, R.M., Moreno, T.R. & Metri, R. (2005) Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22, 461–476.
- Rocha, R.M., Guerra-Castro, E., Lira, C., Pauls, S.M., Hernández, I., Pérez, A., Sardi, A., Pérez, J., Herrera, C., Carbonini, A.K., Caraballo, V., Salazar, D., Diaz, M.C. & Cruz-Motta, J.J. (2010) Inventory of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the National Park La Restinga, Isla Margarita, Venezuela. *Biota Neotropica* 10, 1–10.
- Rodrigues, S.A., Rocha, R.M. & Lotufo, T.M.C. (1998) *Guia ilustrado para Identificação das Ascídias do Estado de São Paulo*. FAPESP.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012) Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61, 539–542.
- Sluiter, C.P. (1898) Tuniciers recueillis en 1896 par la CHAZALIE dans la Mer des Antilles. *Memoires de la Société Zoologique de France* 11, 5–34.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313.
- Stefaniak, L., Lambert, G., Gittenberger, A., Zhang, H., Lin, S. & Whitlatch, R.B. (2009) Genetic conspecificity of the worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002. *Aquatic Invasions* 4, 29–44.
- Tarjuelo, I., Posada, D., Crandall, K.A., Pascual, M. & Turon, X. (2001) Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean. *Marine Biology* 139, 455–462.
- Tarjuelo, I., Posada, D., Crandall, K. A, Pascual, M. & Turon, X. (2004) Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Molecular ecology* 13, 3125–36.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.

- Vandepas, L.E., Oliveira, L.M., Lee, S.S.C., Hirose, E., Rocha, R.M. & Swalla, B.J. (2015) Biogeography of *Phallusia nigra*: Is It Really Black and White? *Biological Bulletin* 228, 52–64.
- Van Name, W.G. (1924) Ascidiens from Curaçao. *Bijdragen tot der Kennis Dierkunde* 23, 23–32.
- Van Name, W.G. (1945) The North and South American ascidians. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 84, 1–476.
- Weis, A. & Melzer, R.R. (2012) How did sea spiders recolonize the Chilean fjords after glaciation? DNA barcoding of Pycnogonida, with remarks on phylogeography of *Achelia assimilis* (Haswell, 1885). *Systematics and Biodiversity* 10, 361–374.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. (2013) A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29, 2869–2876.

Capítulo 3: Além de *Didemnum duplicatum* e *Didemnum galacteum* (Ascidacea: Didemnidae): taxonomia integrativa revela mais espécies com dois folículos testiculares no Atlântico Oeste

LIVIA DE MOURA OLIVEIRA, MARCOS SOARES BARBEITOS & ROSANA MOREIRA DA ROCHA

Abstract

This study is an attempt to solve taxonomic problems related to the delimitation of species with two testis follicles, using a combination of morphological and molecular data. A total of 586 base pairs of the Cytochrome Oxidase 1 gene (COX1) from 32 *Didemnum* specimens collected from the North to the South Atlantic were analysed. These data were used in Maximum Likelihood and Bayesian Inference phylogenetic reconstructions, while species delimitation was performed with the methods Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD), Barcode Index Number System (BIN) and Bayesian Poisson Tree Processes (BPTP). The molecular phylogeny recovered six distinct clades, whereas in the species delimitation analyses 12 to 13 MOTUs were recovered, many of which cannot be distinguished using morphological characters. Our results show that *D. duplicatum* has its distribution throughout the western Atlantic Ocean, whereas *D. galacteum* is restricted to the South Atlantic and new species were revealed in Gulf of Mexico.

Key-words: Species delimitation, COX1, cryptic species, ascidians.

Resumo

Este trabalho trata-se de uma tentativa de resolver os problemas taxonômicos relacionados às espécies a delimitação de espécies que possuem dois folículos testiculares, usando uma combinação de dados morfológicos e moleculares. Foram analisados 586 pares de bases do gene mitocondrial Citocromo Oxidase 1 (COX1) de 32 espécimes de *Didemnum*, coletados desde o Atlântico Norte ao Atlântico Sul. A árvore consenso mostrou seis clados distintos. As análises realizadas para a reconstrução filogenética molecular foram as de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana e para a delimitação de espécies, Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD), Barcode Index Number System (BIN) e Bayesian Poisson Tree Processes (BPTP). A filogenia molecular revelou seis clados distintos, enquanto que nas análises de delimitação de espécies foram recuperados entre 12 e 13 MOTUs. Nossos resultados demonstram que *D. duplicatum* possui sua distribuição ao longo de todo o Atlântico Oeste, enquanto que *D. galacteum* está restrita basicamente ao Atlântico Sul e novas espécies foram reveladas no Golfo do México.

Palavras-chave: Delimitação de espécies, COX1, espécies crípticas, ascídias.

Introdução

A taxonomia tradicional nem sempre demonstra ser uma ferramenta adequada para estabelecer ou esclarecer o relacionamento entre espécies. Assim, a combinação de métodos moleculares com dados morfológicos (taxonomia integrativa) tem sido utilizada como uma importante ferramenta para detectar espécies crípticas, delinear limites de espécies, bem como base para descrições e revisões taxonômicas (Arribas, Andújar, Sánchez-Fernández, Abellán, & Millán, 2013; Cruz-Barraza, Carballo, Rocha-Olivares, Ehrlich, & Hog, 2012; Gutiérrez-Valencia, Gutiérrez, & G. Dias, 2017; Heethoff, Laumann, Weigmann, & Raspotnig, 2011; Pérez-Portela, Arranz, Rius, & Turon, 2013; Razkin, Gómez-Moliner, Vardinoyannis, Martínez-Ortí, & Madeira, 2017; Vandepas et al., 2015; Weiss & Melzer, 2012).

Didemnum duplicatum Monniot, 1983 e *Didemnum galacteum* Lotufo & Dias, 2007 são importantes espécies candidatas para aplicar a taxonomia integrativa uma vez que estas duas espécies, tipicamente do Oceano Atlântico, apresentam características que se sobrepõem (Lotufo & Dias, 2007; Monniot, 1983). Ambas contêm colônias com coloração branca ou laranja claro, espículas globulares, pequenas e com raios rombudos, abertura atrial pequena e, principalmente, dois folículos testiculares envolvidos por 6 – 9 voltas do espermiduto. *Didemnum duplicatum* foi descrita originalmente para Guadalupe (Monniot, 1983) e, desde então, foi registrada no Atlântico Norte (Lambert, Faulkes, Lambert, & Scofield, 2005), na região caribenha (I. Goodbody, 2000, 2003; Rocha et al., 2010) e na costa brasileira (Gama, 2006). Já *D. galacteum* foi originalmente descrita para acomodar os espécimes de coloração branca e com dois folículos testiculares, presentes na costa brasileira (Lotufo & Dias, 2007), que previamente eram identificados como *D. lutarium* Van Name, 1910 na costa sudeste (Rocha & Monniot, 1995), sendo esta espécie a única espécie com dois folículos testiculares presentes na costa brasileira até aquele momento (Lotufo & Dias, 2007). A fase larval fornece os melhores caracteres para a separação entre *D. duplicatum* e *D. galacteum*, já que a primeira apresenta larvas com 8 pares de ampolas ectodérmicas, enquanto a segunda apresenta apenas 4 pares. No entanto, larvas imaturas de *D. duplicatum* também apresentam 4 pares de ampolas em diversos estágios de subdivisão, levando dúvida à validade da separação entre estas espécies.

Também não se conhece ao certo a distribuição geográfica destas espécies devido à alta similaridade entre ambas e à ausência de larvas em diversos materiais coletados ao longo da costa brasileira e também no Caribe (I. Goodbody, 1984a, 1984b, 2000, 2003; Ivan Goodbody, 2000; Rocha et al., 2010). Apenas recentemente, Monniot (2016) reportou tanto *D. duplicatum*

quanto *D. galacteum* para a Guiana Francesa, mostrando a possibilidade de simpatria entre elas. Assim, com tão poucas diferenças entre elas e a presença de descrições incompletas na literatura, torna-se mais fácil confundir os exemplares no momento da identificação, uma vez que, nem sempre, os animais são coletados em sua época reprodutiva.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo usar a taxonomia integrativa para explorar os limites das espécies *D. duplicatum* e *D. galacteum* ao longo de todo o Atlântico Oeste, delimitando-as através da Citocromo Oxidase 1 (COX1) e analisar morfológicamente os espécimes coletados, buscando-se mais caracteres que possam separar espécimes imaturos.

Material e Métodos

Abreviações

DZUP Coleção de Ascidiacea do Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Brasil

LIPY Coleção de Tunicata do Laboratório de Invertebrados Marinhos Paulo Young, Universidade Federal da Paraíba, Brasil

USNM Museu Nacional de História Natural - Instituição Smithsonian, Washington DC, USA

ZMA Museu de Zoologia de Amsterdam, parte do Naturalis Biodiversity Centre, Países Baixos

Amostragem

Foram analisados morfológicamente 32 espécimes de *Didemnum* spp., dos quais 23 espécimes foram provenientes de coletas realizadas na costa brasileira entre 2004 e 2017; cinco foram provenientes do sul do Golfo do México e um dos Estados Unidos; outros quatro espécimes estavam depositados em duas coleções, USNM e ZMA. Estes foram coletados em Belize, Curaçao e Porto Rico (tabela 1). O material foi anestesiado com mentol em água do mar por aproximadamente 2 h. Um pedaço de cada colônia foi diretamente fixado em etanol a 96% para garantir a alta qualidade de DNA para as análises genéticas e outra parte da colônia foi preservado em formalina a 4%. Para delimitar morfológicamente as espécies de *Didemnum* Savigny, 1816 foram utilizados caracteres da colônia, espículas, zooides e larvas. Todas as características foram comparadas às descrições originais das espécies e à descrições publicadas posteriormente. Exceto os espécimes das coleções LIPY, USNM e ZMA, os demais estão

depositados na DZUP. As espículas calcárias foram examinadas sob o microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6360LV com um revestimento rápido de ouro no Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal do Paraná, Brasil e sob o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6480LV com um revestimento rápido de carbono SC-701C no Centro de Biodiversidade Naturalis, Leiden.

Extração de DNA

Parte das extrações de DNA foram realizadas usando um robô de extração Kingfisher e outra parte utilizando o kit de extração da Invitrogen® by Life Technologies. Um pequeno pedaço de cada colônia (3 ou 4 mm³) contendo túnica e zooides foi utilizado para isolar o DNA. Eles foram suspensos em um tubo de 2 ml com T1-Lysis buffer e ProtK e em seguida macerados e incubados a 56 °C em centrífuga a 250 rpm durante a noite. Posteriormente, seguiu-se o protocolo Kingfisher ou Invitrogen para tecido animal.

Amplificação da PCR e sequenciamento

Protocolo 1 (Kingfisher) - Naturalis Biodiversity Centre

A reação de amplificação da PCR seguiu o protocolo da Phire Green Hot Start II DNA Polymerase com algumas modificações. O mix da reação de PCR foi realizado num volume total de 25 µl, sendo 5 µl de 5x Phire Green Reaction Buffer, 1,3 µl de primers Forward 10pMol/µl (Didopt_for/Tun_for), 1,3 µl de primers Reverse 10pMol/µl (Didopt_rev/Tun_rev2), 1,5 µl de dNTP (2,5 mM), 0,5 µl de Phire II Hotstart II DNA taq Polymerase, 1 µl de template e 14,4 µl de água ultrapura. Após a desnaturação inicial a 98 °C durante 30s, foram efetuados 60 ciclos de PCR constituídos de 5s de desnaturação a 98 °C, anelamento de iniciadores a 45 °C durante 5s e extensão a 72 °C durante 15s. Após os ciclos, efetuou-se uma extensão final de 72 °C durante 5 min. Nós utilizamos os iniciadores específicos de tunicados (Stefaniak et al., 2009) e iniciadores específicos de *Didemnum* (Tabela 2 do Capítulo 2).

Tabela 1. Espécimes utilizados nas análises morfológicas e moleculares, incluindo o número de acesso do BOLD para o gene mitocondrial Citocromo Oxidase 1 durante este estudo.

Espécie	Voucher morfologia	Voucher COX1	Localidade	Coordenadas Geográficas
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-773	UPDID035-17	North Carolina, Wilmington	
<i>D. duplicatum</i>	USNM 1092833		Manatee Lagoon, Pelican Cays, Belize	16°38'60" N, 88°12'00" W
<i>D. duplicatum</i>	ZMA TU 1812		Entrada da Baía, Piscadera bay, Curaçao	12°07'23,6" N, 68°58'11,1" W
<i>D. duplicatum</i>	ZMA TU 1813		Interior sul da Baía, Piscadera bay, Curaçao	12°07'33,5" N, 68°58'09,9" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-722	UPDID036-17	Baía da Traição, Paraíba, Brasil	6°41'15" S, 34°55'50" W
<i>D. duplicatum</i>	UFPB TUN-250		Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brasil	6°45'46" S, 34°55'07" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-758		Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brasil	6°45'46" S, 34°55'07" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-763		Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brasil	6°45'46" S, 34°55'07" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-764	UPDID037-17	Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brasil	6°57'52" S, 34°50'34" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-765	UPDID026-17	Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brasil	6°57'52" S, 34°50'34" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-766	UPDID039-17	Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brasil	6°57'52" S, 34°50'34" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-724	UPDID042-17	Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil	7°08'50" S, 34°47'51" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-723	UPDID040-17	Carapibus, Conde, Paraíba, Brasil	7°16'19" S, 34°48'07" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-725	UPDID041-17	Coqueirinho, Conde, Paraíba, Brasil	7°19'14" S, 34°47'40" W
<i>D. duplicatum</i>		UPDID025-17	Ilha do Frade, Bahia, Brasil	12°48'51" S, 38°38'08" W
<i>D. duplicatum</i>		UPDID028-17	Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil	20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W
<i>D. duplicatum</i>		UPDID029-17	Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil	20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-767	UPDID030-17	Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil	20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W
<i>D. duplicatum</i>	DZUP DID-768	UPDID031-17	Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil	20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W

Tabela 1. Continuação.

Espécime	Voucher morfologia	Voucher COX1	Localidade	Coordenadas Geográficas
<i>D. duplicatum</i>		UPDID032-17	Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil	20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W
<i>D. duplicatum</i>		UPDID033-17	Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil	20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-756		Pirambúzios, Parnamirim, Rio Grande do Norte	05°52'34" S, 35°09'06" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-759	UPDID049-17	Barra de Camaratuba, Mataraca, Paraíba, Brasil	6°36'12" S, 34°57'51" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-726		Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brasil	6°46'11" S, 34°55'10" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-771	UPDID051-17	Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Paraíba, Brasil	6°57'52" S, 34°50'34" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-727	UPDID052-17	Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil	7°08'50" S, 34°47'51" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-761		Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil	7°08'50" S, 34°47'51" W
<i>D. galacteum</i>		UPDID044-17	Carapibus, Conde, Paraíba, Brasil	7°16'19" S, 34°48'07" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-772	UPDID054-17	Ponta de Pedras, Goiânia, Pernambuco, Brasil	7°36'55" S, 34°48'33" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-762	UPDID053-17	Praia de Boa Viagem, Recife, Pernambuco, Brasil	8°07'18" S, 34°53'40" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-769	UPDID045-17	Aracruz, Santa Cruz, Espírito Santo, Brasil	20°01'53,12" S, 40°09'29,33" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-770	UPDID046-17	Aracruz, Santa Cruz, Espírito Santo, Brasil	20°01'53,12" S, 40°09'29,33" W
<i>D. galacteum</i>		UPDID047-17	Aracruz, Santa Cruz, Espírito Santo, Brasil	20°01'53,12" S, 40°09'29,33" W
<i>D. galacteum</i>		UPDID048-17	Aracruz, Santa Cruz, Espírito Santo, Brasil	20°01'53,12" S, 40°09'29,33" W
<i>D. galacteum</i>		UPDID055-17	Ilha do Mel, Paraná, Brasil	25°34'24" S, 48°18'35" W
<i>D. galacteum</i>	DZUP DID-721		Itapema do Norte, Santa Catarina, Brasil	26°04'12" S, 48°36'21" W

Tabela 1. Continuação.

Espécime	Voucher morfologia	Voucher COX1	Localidade	Coordenadas Geográficas
<i>Didemnum</i> sp.1	DZUP DID-774	UPDID137-17	Madagascar, Sisal, México	21°26'16" N, 90°16'39" W
<i>Didemnum</i> sp.2	DZUP DID-776	UPDID128-17	Barco Hundido, Sisal, México	19°43'61" N, 90°47'89" W
<i>Didemnum</i> sp.2	DZUP DID-777	UPDID129-17	Barco Hundido, Sisal, México	19°43'61" N, 90°47'89" W
<i>Didemnum</i> sp.3	DZUP DID-775	UPDID135-17	Barco Hundido, Sisal, México	19°43'61" N, 90°47'89" W
<i>Didemnum</i> sp.4	DZUP DID-778	UPDID136-17	Barco Hundido, Sisal, México	19°43'61" N, 90°47'89" W

Protocolo 2 (Invitrogen) - Universidade Federal do Paraná

Para reação de amplificação da PCR seguiu-se o protocolo da taq Phire Green Hot Start II DNA Polymerase com modificações na preparação do mix. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 µl, sendo 2,5 µl de 10x Platinum Reaction Buffer, 1 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de BSA (100 mM), 1 µl de primer Tun_for 10pMol/µl, 1 µl de primer Tun_rev2 10pMol/µl, 0,5 µl de dNTP (2,5 mM), 0,3 µl de Platinum taq DNA Polymerase, 1 µl de template e 16,7 µl de água ultrapura. As reações de PCR foram efetuadas utilizando os mesmos parâmetros descritos acima, com exceção do número de ciclos que foram reduzidos para 40. Os iniciadores utilizados foram aqueles reportados por Stefaniak *et al.* (2009).

Reconstrução filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas em base de dados online do Genbank, através do algoritmo BLAST implementado no NCBI (Johnson *et al.* 2008). Algumas sequências foram montadas usando o programa Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), enquanto outras foram montadas usando o programa Bioedit versão 7.2.5 (Hall, 1999). Posteriormente, elas foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994), implementado no Programa Bioedit versão 7.2.5 (Hall, 1999). Após a inclusão do grupo externo *Didemnum albidum* (acesso Genbank EU419432), todas as sequências foram realinhadas usando o mesmo algoritmo anterior. Os cromatogramas foram reavaliados e as sequências editadas manualmente nos casos de regiões que não foram satisfatoriamente resolvidas pelo programa.

As reconstruções filogenéticas foram baseadas em dois critérios: máxima verossimilhança (MV) e inferência Bayesiana (IB). A árvore de MV foi gerada através do programa RAxML-HPC2 (v8.2.10) implementado no sistema XSEDE, disponível no portal CIPRES v.3.3. (Miller, Pfeiffer, & Schwartz, 2010) (Stamatakis, 2014). O suporte foi estimado por 1000 pseudo-replicações de bootstrap. Para IB, empregou-se o programa MrBayes (v3.2.6), também implementado em XSEDE (Ronquist et al., 2012). A análise Bayesiana foi realizada utilizando-se 2 corridas com 4 cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) de 10⁶ gerações cada.

Delimitação dos MOTUs (Molecular Operational Taxonomic units)

Foram utilizados os seguintes métodos para delimitação de espécies: Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD; Puillandre et al. 2012), Barcode Index Number System (BIN; Ratnasingham & Hebert 2013), Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP; Zhang et al. 2013). Os métodos de delimitação molecular foram checados pelo estudo morfológico dos caracteres dos exemplares.

A análise de ABGD foi utilizada com o objetivo de testar se os clusters compreendem espécies crípticas. Esta análise foi realizada através do servidor ABGD web (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>) com as configurações padrão. Para a análise BPTP, a qual utiliza uma abordagem baseada em coalescência para a delimitação de espécies, a árvore obtida com RAxML-HPC2 on XSEDE (8.2.10) foi usada como arquivo de entrada no servidor web BPTP (<http://species.h-its.org/>). Um BIN foi atribuído para cada sequência para distinguir intervalos (barcode gaps) nas distâncias genéticas entre grupos de indivíduos, tendo como referência o banco de dados genéticos BOLD v.4 (<http://www.barcodinglife.org>; Ratnasingham & Hebert 2007), o qual também inclui sequências do banco de dados GenBank. Para a construção da árvore da identidade dos táxons (BIN) utilizou-se o modelo de distância Kimura de 2 parâmetros, o qual fornece correção mais precisa de pequenas distâncias genéticas (Kimura 1980). Este modelo de distância agrupa as sequências de forma algorítmica e fornece informações que podem ser utilizadas para identificar espécies assim como documenta a diversidade quando faltam informações taxonômicas a partir de sequências sem informações taxonômicas anteriores (Ratnasingham & Hebert 2007).

Resultados

Um fragmento de 586 pares de base da COX1 foi sequenciado para 31 espécimes de *Didemnum* spp, com um total de 28 haplótipos distintos, 269 sítios variáveis e 174 sítios informativos de acordo com o critério de máxima parcimônia. A distância genética intraespecífica variou de 0,03 a 0,043, enquanto que a distância interespecífica variou de 0,087 a 0,236. A menor distância genética entre as espécies foi encontrada entre *Didemnum* sp. 2 e *Didemnum* sp. 3 (0,087), enquanto que as maiores distâncias genéticas foram encontradas entre *D. duplicatum* e *D. galacteum* (0,236) (Tabela 2).

A árvore filogenética consenso baseada nas análises de máxima verossimilhança (MV) e inferência Bayesiana (IB) revelou uma primeira divisão separando *D. galacteum* das demais

espécies. A seguir separam-se os espécimes do Golfo do México em 4 clados distintos, sendo que o último é grupo irmão de *D. duplicatum* (Figura 1). Os únicos ramos que são bem suportados (MV = 100% e IB = 1) são o que suporta o clado (*Didemnum* sp. 4 + *D. duplicatum*) e aquele que agrupa os espécimes de *D. duplicatum*. O ramo que suporta os clados *Didemnum* sp.2 e *Didemnum* sp. 3, ambos do Golfo do México, possui um suporte apenas na inferência Bayesiana (MV = 71% e IB=1) (fig. 1).

Dentre os três clados observados para *D. galacteum*, um refere-se apenas a um espécime da Paraíba; o segundo agrupa os espécimes do nordeste do Brasil (Paraíba e Pernambuco) e o terceiro agrupa os espécimes da região sudeste/sul do Brasil (Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina). O ramo que suporta os espécimes do Nordeste possui um suporte significativo de bootstrap (MV = 83%), e suporte intermediário de probabilidade posterior (IB = 0,97), enquanto que o ramo que suporta o clado formado pelos espécimes da região Sudeste/Sul não possui nenhum suporte significativo. Para *D. duplicatum* também foram observados três clados, dentre os quais um agrupa o espécime dos Estados Unidos juntamente com os espécimes da Paraíba (nordeste do Brasil) com o ramo suportado por valores significativos de bootstrap de 96% e probabilidade posterior de 1, e os outros dois clados referem-se aos espécimes do Espírito Santo (região sudeste do Brasil). O ramo que suporta um desses clados do Espírito Santo não possui um suporte significativo de bootstrap, indicando que a relação dos espécimes dessa região ainda não está bem clara.

Os métodos ABGD e BIN revelaram que podem existir, pelo menos, 12 ou 13 MOTUs, enquanto que bPTP mostrou evidências de que há sete MOTUs. Já a análise morfológica revelou caracteres diferenciais apenas para seis clados distintos. O clado *D. galacteum* é formado por espécimes de coloração branca, algumas vezes com zooides alaranjados ou róseos (Lotufo, 2002; Lotufo & Dias, 2007), órgão torácico em formato de aba e larvas com 0,6 mm de tronco e 4 pares de ampolas ectodérmicas arredondadas. *Didemnum duplicatum* e *Didemnum* sp.2 apresentam coloração branca e larvas com 8 pares de ampolas ectodérmicas, com 0.7-0.8 mm e 1 mm de comprimento de tronco, respectivamente, porém estas espécies podem ser separadas pelo formato do órgão torácico lateral que tem formato ondulado ou de raio em *D. duplicatum* e formato circular (aba) em *Didemnum* sp.2. O clado *Didemnum* sp. 1 é caracterizado por possui a colônia alaranjada *in situ*, órgão torácico lateral pequeno e em formato de meia-lua, 9 voltas do espermiduto e larva com 1 mm de comprimento, enquanto *Didemnum* sp.3 possui coloração amarela e órgão torácico lateral alongado e saliente. *Didemnum* sp.2 possui coloração branca, órgão torácico circular e saliente, 8 voltas do

espermiduto, larvas com 1 mm de comprimento de tronco e 8 pares de ampolas ectodérmicas alongadas. Já a espécie *Didemnum* sp. 3 possui coloração amarelada, espículas com as órgãos torácico alongado e saliente e 8 voltas do espermiduto. A espécie *Didemnum* sp. 4 possui coloração branca e órgão torácico lateral circular.

Descrições das espécies

Gênero *Didemnum* Savigny, 1816

Didemnum duplicatum Monniot, 1983

(Figuras 3-8)

Didemnum duplicatum Monniot, 1983. Monniot, 2016: 206.

Material examinado. DZUP Did-773 Wilmington, Carolina do Norte, Estados Unidos, 1 colônia, 24/07/2014, *leg.* Lambert, G. USNM 1092833, Manatee Lagoon, Pelican Cays, Belize (16°38'60" N, 88°12'00" W), 1 colônia, BZ-PCY-163, 27/04/1993, *leg.* Goodbody, I. ZMA TU 1812, Entrada da Baía, Piscadera bay, Curaçao (12°07'23,6" N, 68°58'11,1" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, estação N° 1464, substrato Rhizophora, 28/11/1963, *leg.* RUU. ZMA TU 1813, Interior sul da Baía, Piscadera bay, Curaçao (12°07'33,5" N, 68°58'09,9" W), 1 colônia, 0 – 1 m, estação N° 1469, substrato Rhizophora, 18/12/1963, *leg.* RUU. ZMA TU 18, Isla Maguey, costa sul de Porto Rico, on mangrove roots. 05/02/1963, *leg.* J.H. Stock. DZUP DID-722, Baía da Traição, Paraíba, Brasil (6°41'15" S, 34°55'50" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâmina DID-4.07, 12/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. UFPB TUN-250, Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brasil (6°45'46" S, 34°55'07" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 10/01/2009, *leg.* Projeto Biota Paraíba. DZUP DID-758, Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brasil (6°45'46" S, 34°55'07" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâmina DID 4.28, 14/03/2013, *leg.* L.M. Oliveira. DZUP DID-763, Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brasil (6°45'46" S, 34°55'07" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâmina DID 4.29, 14/03/2013, *leg.* L.M. Oliveira. DZUP DID-764, Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brasil (6°57'52" S, 34°50'34" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 25/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-765, Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brasil (6°57'52" S, 34°50'34" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 25/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-766, Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brasil (6°57'52" S, 34°50'34" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 25/03/2013, *leg.* Oliveira, L.

Tabela 2. Distância média genética entre e dentro (diagonal) das espécies de *Didemnum* calculada pelo método p-distance. Os valores abaixo da diagonal são as distâncias entre os haplótipos, Enquanto que os valores acima da diagonal indicam a significância para 999 bootstrap.

Haplótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1 UPDID035-17_D. duplicatum		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
2 UPDID036-17_D. duplicatum	0,05		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
3 UPDID037-17_D. duplicatum	0,03	0,02		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4 UPDID039-17_D. duplicatum	0,02	0,02	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
5 UPDID026-17_D. duplicatum	0,02	0,03	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
6 UPDID040-17_D. duplicatum	0,02	0,03	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
7 UPDID041-17_D. duplicatum	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
8 UPDID042-17_D. duplicatum	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
9 UPDID028-17_D. duplicatum	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
10 UPDID029-17_D. duplicatum	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
11 UPDID031-17_D. duplicatum	0,05	0,06	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
12 UPDID025-17_D. duplicatum	0,06	0,05	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
13 UPDID030-17_D. duplicatum	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
14 UPDID032-17_D. duplicatum	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
15 UPDID033-17_D. duplicatum	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
16 UPDID051-17_D. galacteum	0,23	0,23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22	-	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
17 UPDID049-17_D. galacteum	0,24	0,24	0,23	0,22	0,22	0,22	0,23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,21	0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
18 UPDID052-17_D. galacteum	0,22	0,23	0,22	0,21	0,21	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
19 UPDID054-17_D. galacteum	0,23	0,24	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,21	0,22	0,23	0,23	0,22	0,01	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
20 UPDID053-17_D. galacteum	0,22	0,23	0,22	0,21	0,21	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22	0,00	0,07	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
21 UPDID045-17_D. galacteum	0,20	0,21	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,20	0,20	0,20	0,04	0,08	0,04	0,05	0,04	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Tabela 2. Continuação.

	Haplótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
22	UPDID046-17_D. galacteum	0,20 4	0,21 3	0,19 9	0,19 7	0,19 5	0,19 5	0,19 9	0,19 5	0,19 5	0,19 5	0,19 4	0,19 9	0,20 2	0,20 2	0,19 9	0,04 9	0,07 9	0,04 4	0,05 2	0,04 4	0,00 3	0,04 3	0,00 3	0,00 4	0,01 4	0,01 4	0,01 2	0,01 1	
23	UPDID047-17_D. galacteum	0,20 2	0,21 3	0,19 7	0,19 5	0,19 4	0,19 4	0,19 9	0,19 4	0,19 7	0,19 7	0,19 5	0,19 9	0,20 4	0,20 4	0,20 1	0,05 2	0,08 6	0,04 7	0,05 6	0,04 7	0,00 3	0,00 7		0,00 5	0,01 4	0,01 4	0,01 2	0,01 1	
24	UPDID055-17_D. galacteum	0,20 9	0,21 8	0,20 4	0,20 2	0,20 1	0,20 1	0,20 4	0,20 1	0,20 1	0,20 1	0,19 9	0,20 4	0,20 8	0,20 8	0,20 4	0,05 2	0,07 9	0,04 7	0,05 6	0,04 7	0,01 0	0,01 0	0,01 4		0,01 5	0,01 4	0,01 2	0,01 1	
25	UPDID137- 17_Didemnum1	0,18 5	0,19 0	0,17 5	0,17 3	0,17 3	0,17 3	0,17 5	0,17 1	0,16 4	0,16 2	0,16 2	0,16 4	0,17 5	0,17 3	0,17 1	0,17 5	0,19 7	0,17 1	0,17 6	0,17 1	0,16 4	0,16 2	0,16 6	0,16 4	-	0,01 5	0,01 4	0,01 4	
26	UPDID135- 17_Didemnum2	0,21 6	0,22 3	0,21 3	0,21 1	0,20 9	0,20 9	0,21 5	0,20 9	0,20 8	0,20 8	0,20 8	0,20 2	0,20 9	0,20 9	0,20 6	0,14 0	0,15 2	0,14 0	0,14 0	0,14 0	0,13 1	0,12 9	0,13 1	0,12 7	0,12 3	0,18 3	-	0,01 1	0,01 3
27	UPDID128- 17_Didemnum3	0,20 4	0,21 5	0,19 7	0,19 5	0,19 4	0,19 4	0,19 9	0,19 4	0,19 9	0,19 9	0,19 5	0,19 9	0,20 2	0,20 2	0,19 9	0,12 2	0,14 5	0,11 7	0,12 2	0,11 7	0,10 6	0,10 5	0,10 6	0,10 6	0,10 1	0,16 7	0,08 7	-	0,01 2
28	UPDID136- 17_Didemnumsp4	0,20 8	0,21 8	0,20 1	0,19 9	0,19 9	0,19 9	0,20 1	0,20 1	0,20 2	0,20 1	0,20 1	0,20 4	0,20 6	0,20 4	0,20 6	0,08 7	0,11 3	0,08 2	0,09 1	0,08 2	0,07 9	0,07 7	0,08 2	0,07 9	0,07 2	0,15 2	0,12 2	0,09 6	-

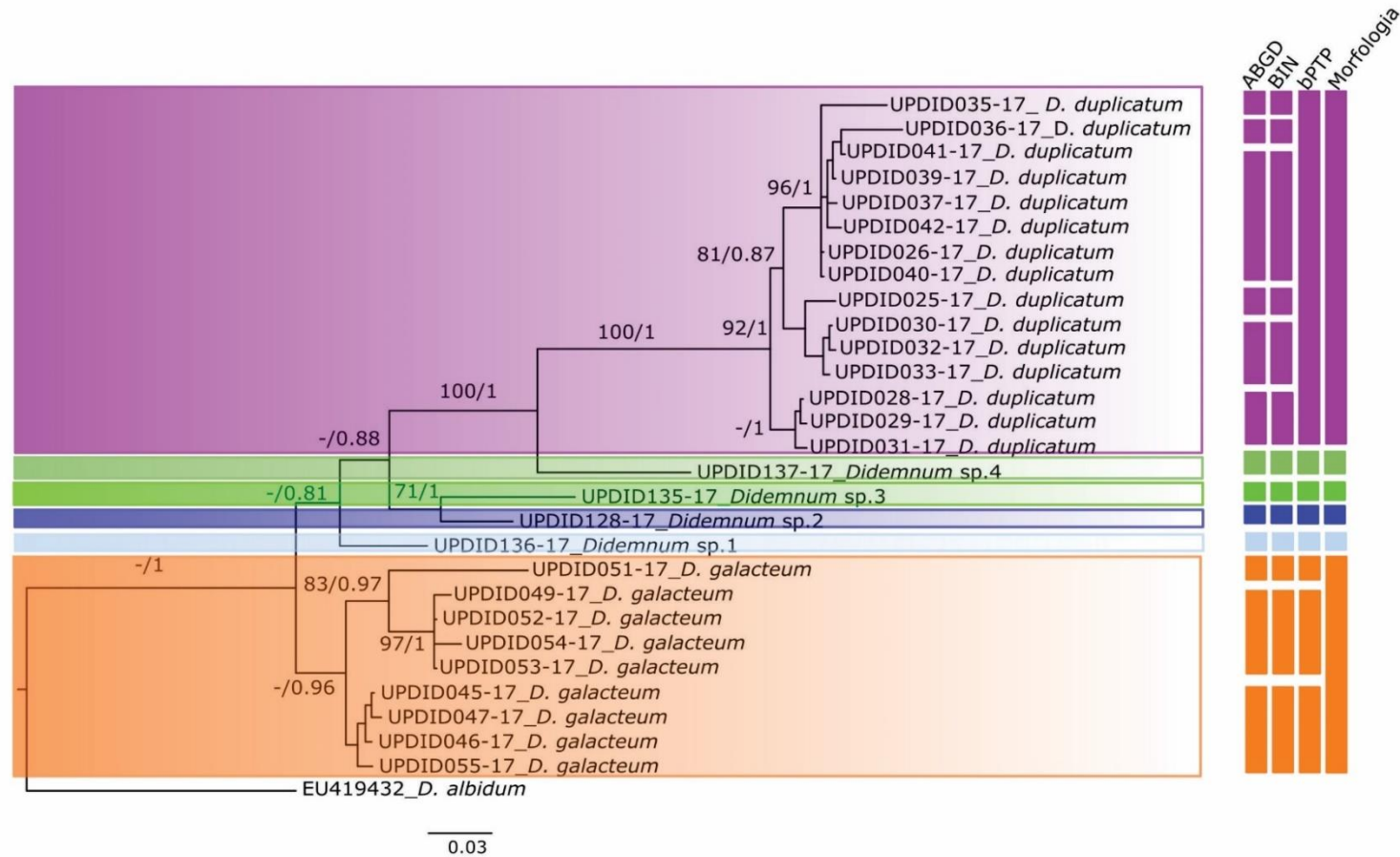


Figura 1. Árvore consenso bayesiana obtida por regra da maioria baseada em 586 nucleotídeos para o gene COX1 de 28 haplótipos de *Didemnum* spp. As linhas verticais representam os resultados das análises de delimitação de espécies: ABGD, BIN, bPTP e morfologia, sendo que apenas clados com caracteres suficientes para sua diferenciação estão identificados por cores. Os números nos ramos são valores de suporte de bootstrap e probabilidade posterior, respectivamente. A árvore foi enraizada pela sequência obtida no Genbank de *D. albidum* (EU419432).

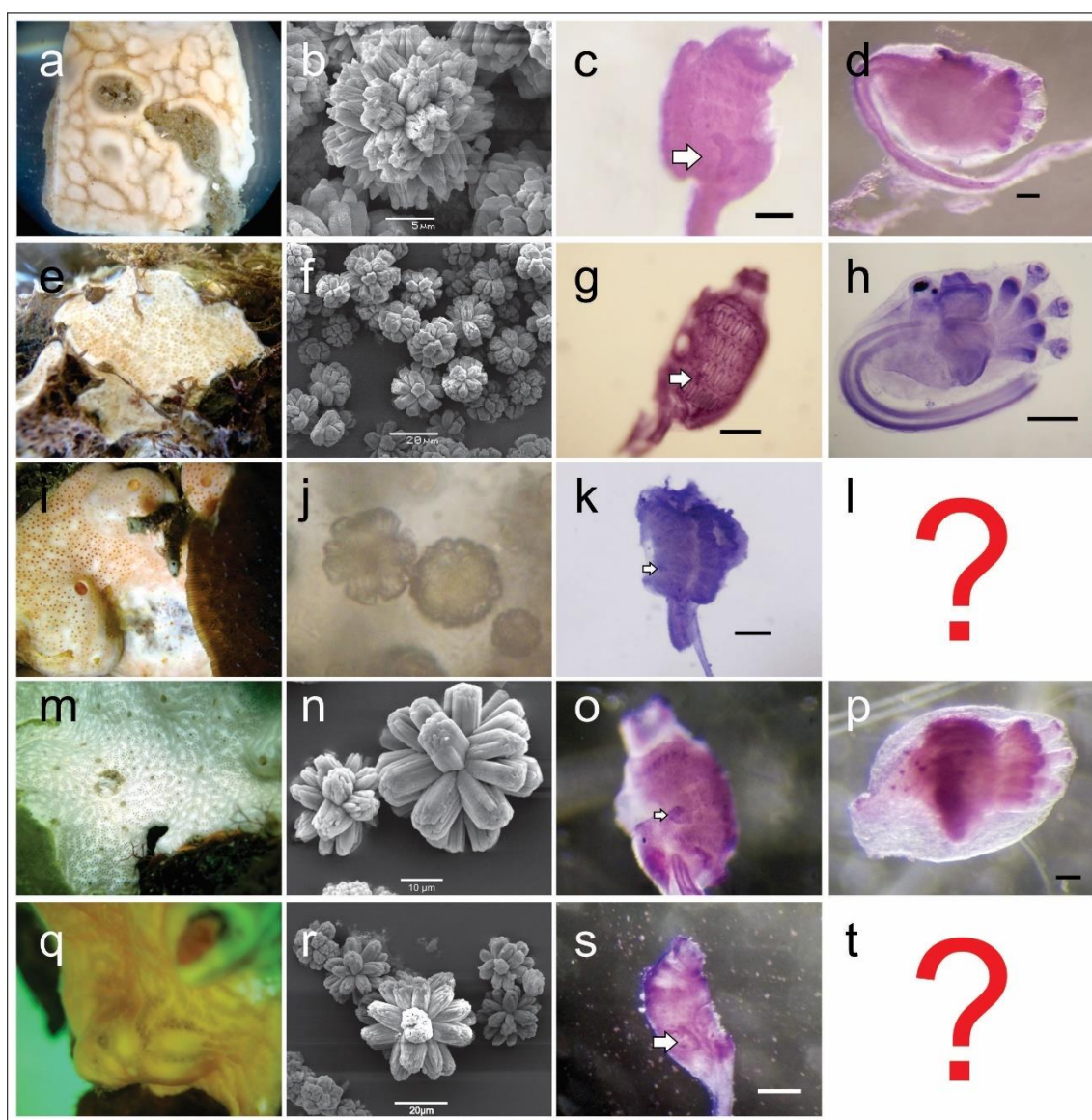


Figura 2. Prancha comparativa dos clados de *Didemnum* spp. delimitados pelas análises apresentadas na figura 1. Cada fileira representa características da colônia *in situ*, espículas, formato do órgão torácico lateral e larva (zooides e larvas corados com hematoxilina). a-d, *Didemnum duplicatum*; e-h, *Didemnum galacteum*; i-l, *Didemnum* sp.1; m-p, *Didemnum* sp.2; q-t, *Didemnum* sp.3. *Didemnum* sp.4 não está representada pois os zooides estavam danificados. Escalas para zooides e larvas: 0,1 mm.

M. DZUP DID-724, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil (7°08'50" S, 34°47'51" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâmina DID 4.10, 28/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-723, Carapibus, Conde, Paraíba, Brasil (7°16'19" S, 34°48'07" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâminas DID 4.08 e DID 4.09, 26/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-725, Coqueirinho, Conde, Paraíba, Brasil (7°19'14" S, 34°47'40" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâmina DID 4.11, 27/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-767, Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil (20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W), 1 colônia, 27/03/2017, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-768, Ilha Rasa de Terra, Espírito Santo, Brasil (20°40'31,9" S, 40°22'1,03" W), 1 colônia, 27/03/2017, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. As colônias são brancas, às vezes, com algas simbiotes na superfície da colônia. Elas medem entre 5 – 10 cm em diâmetro e 1 – 5 mm de espessura. Os sistemas cloacais são visíveis. A túnica é quebradiça com alta densidade de espículas em toda a matriz da túnica. Ao redor de cada sifão oral, há um acúmulo de espículas que formam papilas na superfície da colônia, seguindo os canais dos sistemas cloacais. As espículas são de dois tipos. Uma com formato globular sem raios definidos e outro com formato globular com 6-8 raios cilíndricos e rombudos, usualmente 6, em uma secção ótica transversal. Elas têm cerca de 20 µm de diâmetro, não mais do que 30 µm.

Os zooides medem 1,1 – 1,3 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos e arredondados. A abertura atrial é fechada, quase um tubo, abrindo-se entre a 2ª e a 3ª fileira de fendas faríngeas. A faringe tem cerca de 10-9-9-8 fendas em cada fileira. Os órgãos laterais torácicos variam em forma dentro da mesma colônia. São alongados, com formato de raio ou onda, localizando-se na altura da 3ª fileira de fendas, próximos à abertura atrial, algumas vezes, estendendo-se até a 4ª fileira. O pedúnculo esofágico retal é longo. O processo muscular é mais longo que o abdome, projetando-se da região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O abdômen posiciona-se horizontalmente em relação ao tórax. Um tecido glandular em forma de meia-lua encontra-se sobre a alça intestinal primária, posterior ao nível do estômago e do lado contrário às gônadas. O testículo é dividido em dois lobos, globulares, rodeados por 7 voltas do espermiduto.

As larvas não são gemíparas, medem de 0,7 – 0,8 mm de comprimento de tronco. A cauda descreve $\frac{3}{4}$ de volta ao redor do tronco. As papilas adesivas são equidistantes e possuem o pedúnculo fino e longo. Elas possuem oito pares de ampolas ectodérmicas

arredondadas e curtas. A vesícula sensorial (estatocito e ocelo) está presente na região posterior da larva. O ocelo é posterior ao estatocito.

Comentários. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 foi originalmente descrita para o Mar do Caribe (Monniot, 1983) e no Brasil foi reportada pela primeira vez por Gama et al. (2006) na Paraíba. Devido à ausência de larvas nas amostras analisadas antes deste presente estudo e em sua alta similaridade com *D. galacteum* Lotufo & Dias, 2007, muitos espécimes foram mal identificados. Os espécimes descritos por Monniot (1983) possuem coloração branca a rosada, zooides com 1,5 mm de comprimento, órgão torácico alongado e saliente, 5 – 9 voltas do espermiduto e larvas com 0,9 mm de comprimento de tronco e 4 pares de ampolas ectodérmicas duplicadas em cada lado (ou seja, 8 pares de ampolas). Os espécimes dos Estados Unidos e os da Paraíba contém o conjunto de características de acordo com a descrição original da espécie (Figuras 2, 6 e 7), enquanto que os espécimes de Belize e do Espírito Santo possuem variação no formato do órgão torácico, porém as espículas são iguais. O órgão torácico é alongado, porém de

Distribuição Geográfica. Localidade tipo: Guadalupe (Monniot, 1983). Outras localidades: Belize (Goodbody, 2000), Jamaica (Goodbody, 2003), Panamá (Rocha *et al.*, 2005), Venezuela (Rocha *et al.* 2010), Guiana Francesa (Monniot 2016), Brasil (Gama *et al.*, 2006; presente estudo).

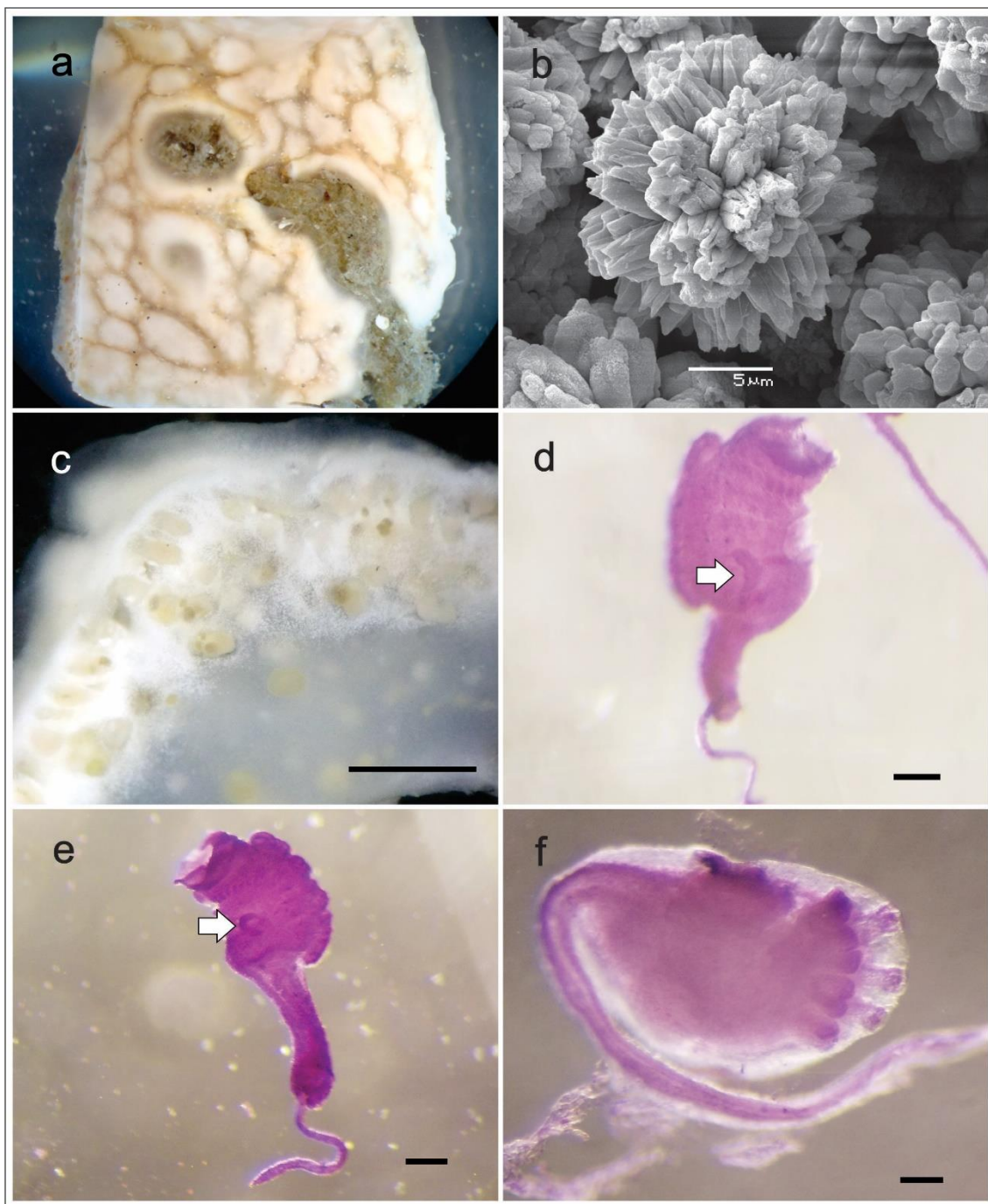


Figura 3. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 – EUA. a, colônia preservada - espécime DZUP DID 773. b, espículas. c, corte transversal da colônia. d-e, tórax, seta indicando o órgão torácico lateral. f, larva (zooides e larvas corados com hematoxilina). Escalas: c = 1 mm. d-f = 0,1 mm.

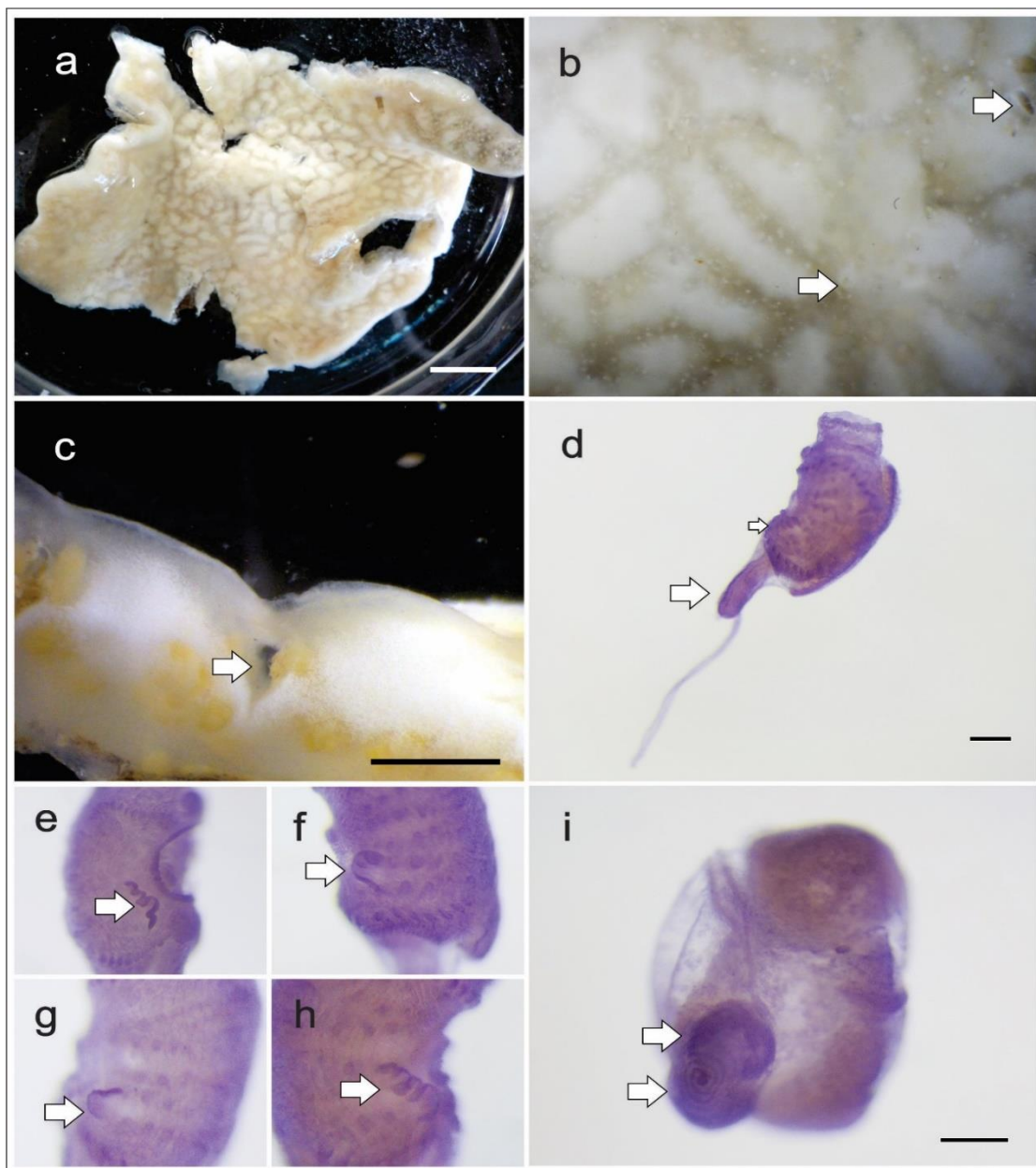


Figura 4. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 – Belize. a, colônia preservada - espécime USNH 1092833. b, detalhe da superfície da colônia. As setas indicam as aberturas cloacais. Observa-se também que os zooides estão dispostos em sistemas. c, corte transversal da colônia. A seta indica a cavidade cloacal. d, tórax. A seta menor indica a localização do órgão torácico lateral e a seta maior indica o pedúnculo esofágico-retal. e-h, variação do órgão torácico lateral dentro da mesma colônia. i, abdome. As setas indicam os dois folículos testiculares rodeados pelas voltas do espermiduto (zooides e larvas corados com hematoxilina). Escalas: a = 1 cm; c = 1 mm; d, i = 0,1 mm.

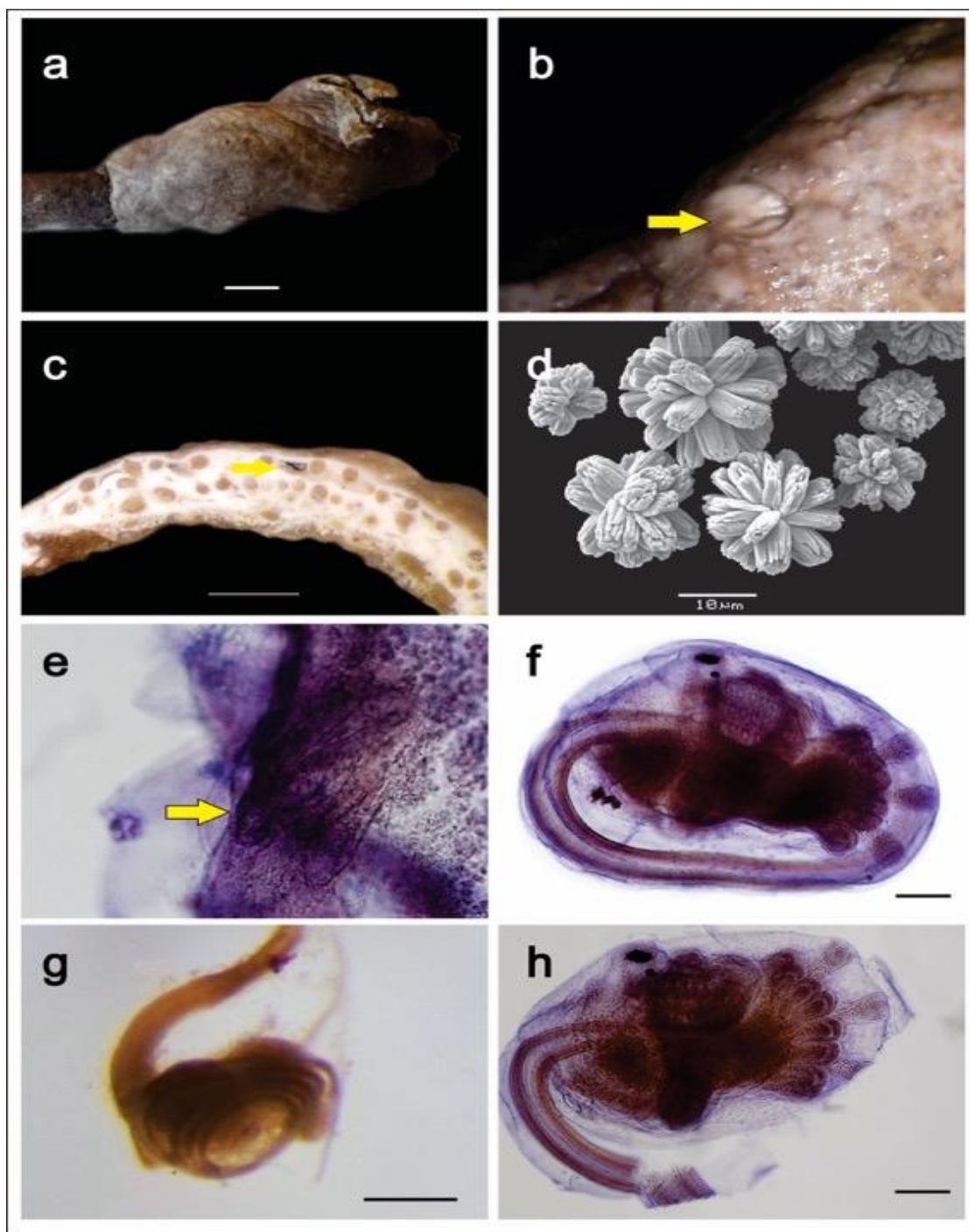


Figura 5. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 – Porto Rico. a, colônia preservada - espécime USNH 1092833. b, detalhe da superfície da colônia. A seta indica uma abertura cloacal. c, corte transversal da colônia. A seta indica a cavidade cloacal. d, espículas. e, túbulos pilóricos. g, testículo dividido em dois folículos, rodeados pelo espermiduto. f-h, larvas (zooides e larvas corados com hematoxilina). Escalas: c = 1 mm. f-h = 0,1 mm.

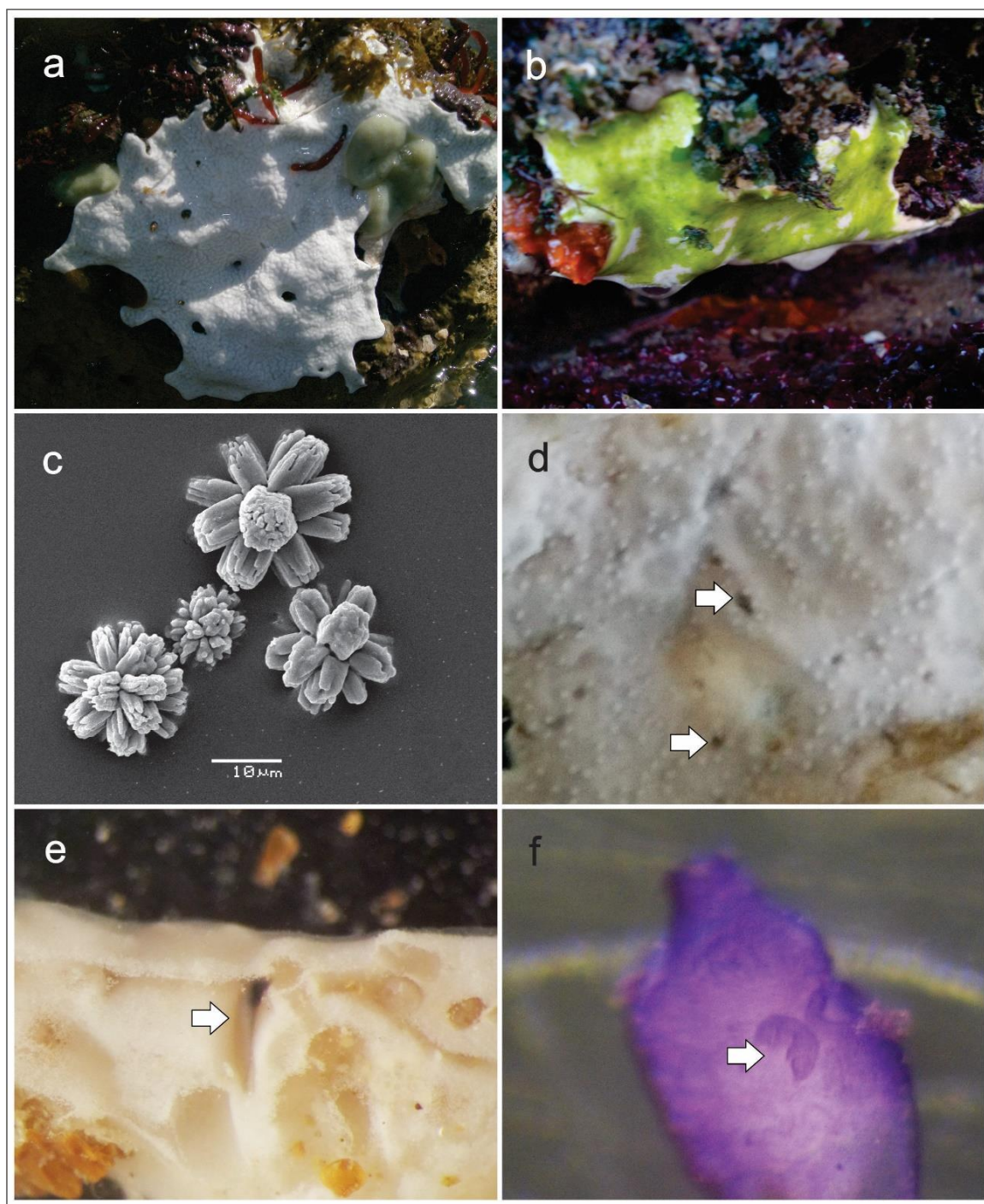


Figura 6. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 – Brasil (Paraíba). a – b, colônias *in situ*. Na figura b, observa-se algas simbiotes. c, espículas. d, detalhe da superfície da colônia com as setas indicando as aberturas cloacais. e, corte transversal da colônia. Seta indica a cavidade cloacal. f, tórax com a seta indicando o órgão torácico lateral (zooides e larvas corados com hematoxilina).

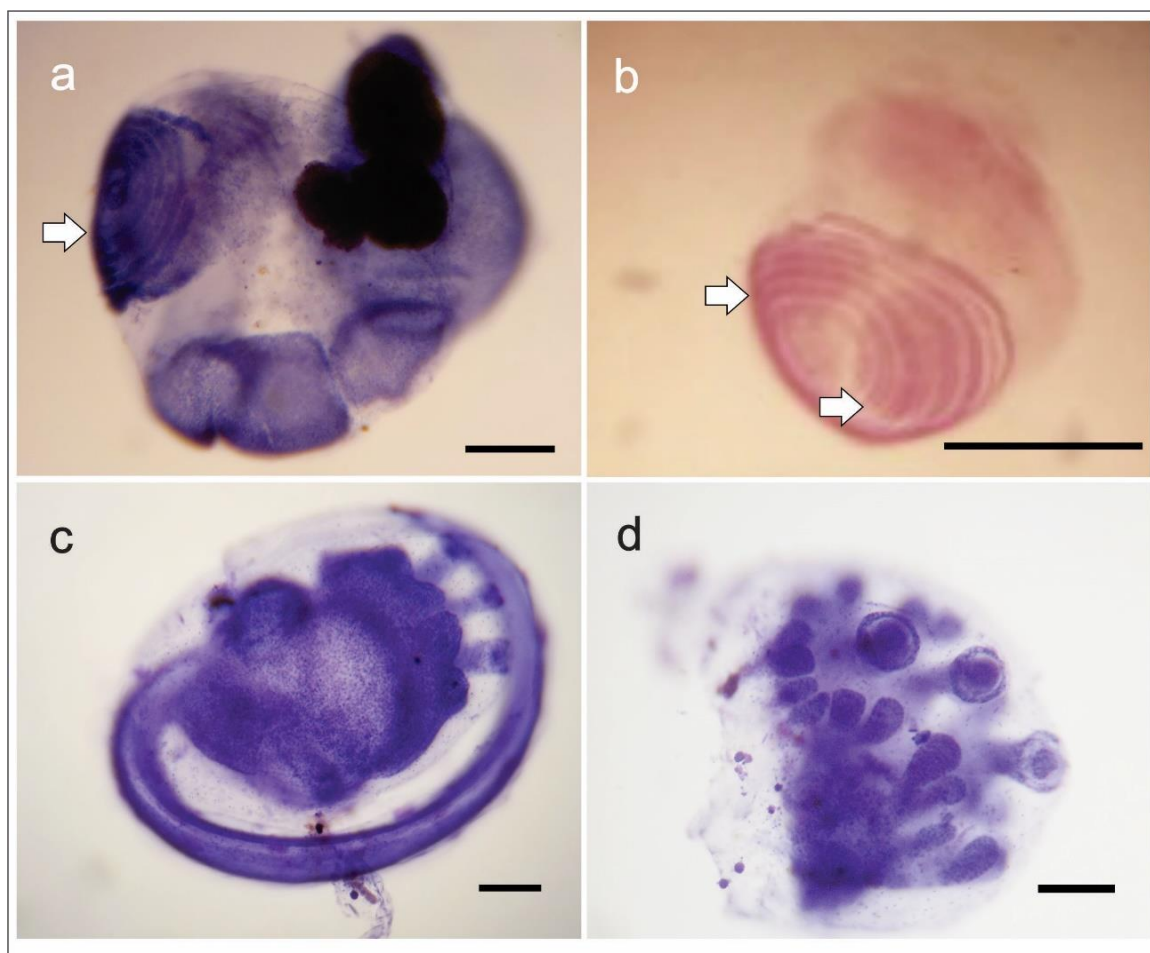


Figura 7. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 – Brasil (Paraíba). a, abdome com a seta indicando o testículo dividido em dois folículos, rodeados pelo espermiduto. b, testículo. Setas indicam os folículos. c, larva imatura. d, detalhes das ampolas ectodérmicas em larva madura (zooides e larvas corados com hematoxilina). Escala: 0,1 mm.

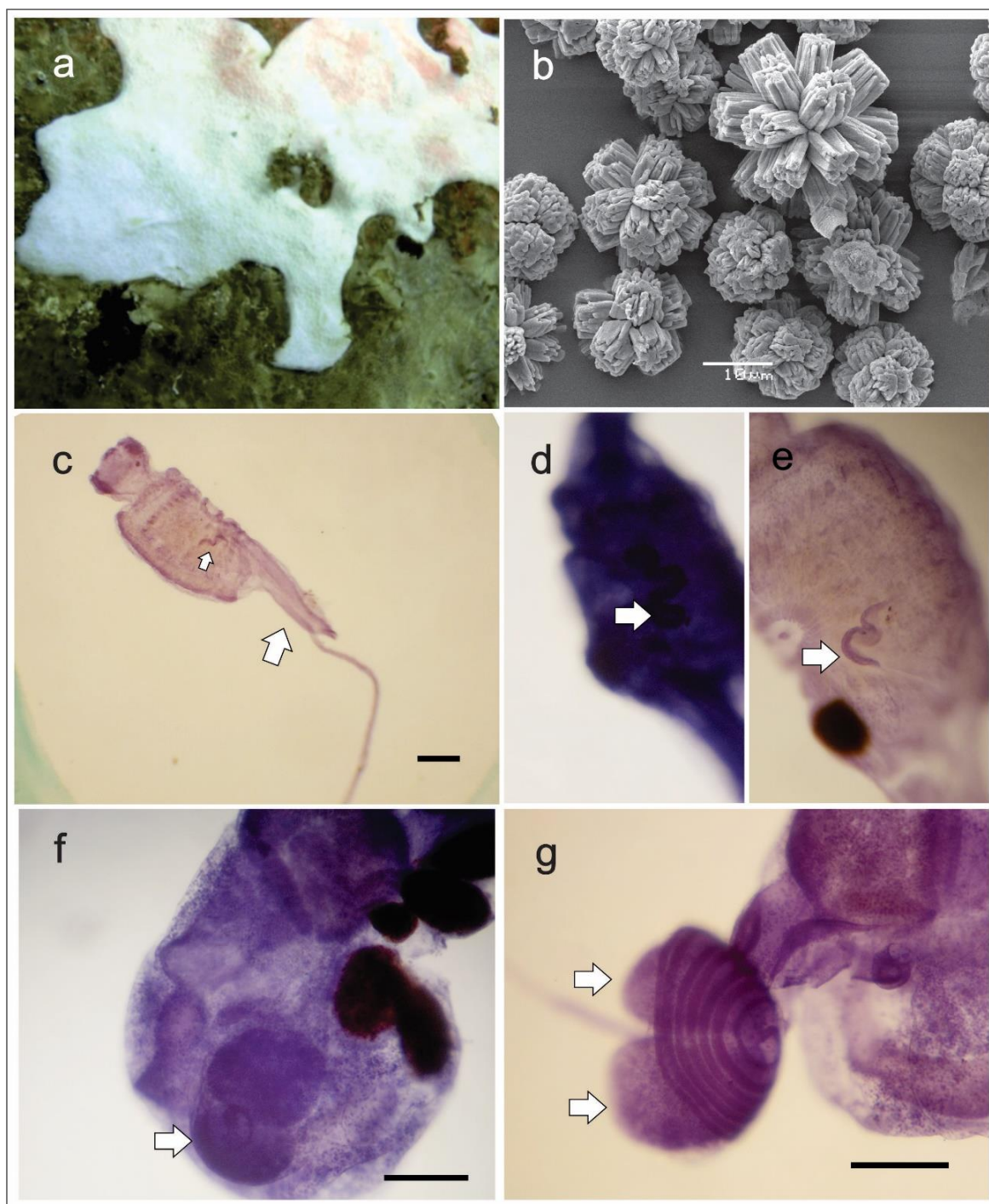


Figura 8. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 – Brasil (Espírito Santo). a, colônia in situ. b, espículas. c, tórax. Seta maior indica o pedúnculo esofágico retal e a seta menor o órgão torácico lateral. d, variação do órgão torácico lateral (setas). e, abdome com a seta para o testículo. f, testículo dividido em dois folículos (setas), rodeados pelo espermiduto (zooides e larvas corados com hematoxilina). Escalas: 0,1 mm.

Didemnum galacteum Lotufo & Dias, 2007

(Figura 9)

Didemnum galacteum Lotufo & Dias, 2007. Monniot, 2016: 207.

Material examinado. DZUP DID-756, Pirambúzios, Parnamirim, Rio Grande do Norte (05°52'34" S, 35°09'06" W), 1 colônia, 2 m, 28/08/2015, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-759, Barra de Camaratuba, Mataraca, Paraíba, Brasil (6°36'12" S, 34°57'51" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 13/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-726, Barra de Mamanguape, Rio Tinto, Paraíba, Brasil (6°46'11" S, 34°55'10" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâminas DID 4.14 e DID 4.15, 14/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-771, Quebramar Cabedelo, Cabedelo, Brasil (6°57'52" S, 34°50'34" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 25/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-761, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil (7°08'50" S, 34°47'51" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâmina DID 4.27, 28/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-727, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil (7°08'50" S, 34°47'51" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 28/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-761, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil (7°08'50" S, 34°47'51" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 28/03/2013, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-772, Ponta de Pedras, Goiana, Pernambuco, Brasil (7°36'55" S, 34°48'33" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 01/09/2015, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-762, Praia de Boa Viagem, Recife, Pernambuco, Brasil (8°07'18" S, 34°53'40" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, 31/08/2015, *leg.* Oliveira, L.M. DZUP DID-769, Santa Cruz, Aracruz, Espírito Santo, Brasil (20°01'53,12" S, 40°09'29,33" W), 1 colônia, 0 – 0,3 m, 25/01/2012, *leg.* Gamba, G. A. DZUP DID-770, Santa Cruz, Aracruz, Espírito Santo, Brasil (20°01'53,12" S, 40°09'29,33" W), 1 colônia, 0 – 0,3 m, 25/01/2012, *leg.* Gamba, G. A. DZUP DID-721, Itapema do Norte, Santa Catarina, Brasil (26°04'12" S, 48°36'21" W), 1 colônia, 0 – 0,5 m, lâminas DID 4.12 e DID 4.13, 09/03/2017, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. As colônias possuem coloração branca in situ. Em algumas colônias, foram encontradas grande quantidade de pelotas fecais nos sistemas cloacais, tornando-os visíveis na superfície da colônia. Os espécimes, geralmente, medem mais que 6 cm de diâmetro e 1 – 2 mm de espessura. A túnica é quebradiça, mas também pode

ser maleável, possui alta densidade de espículas, as quais estão distribuídas uniformemente em toda a colônia. A superfície da colônia contém papilas relacionadas ao sifão oral. As espículas são de dois tipos: um com formato globular sem raios definidos e outro com raios rombudos e cilíndricos com 4 - 5 raios em seção transversal óptica, medindo cerca de 20-25 µm de diâmetro.

Os zooides são brancos, mas em algumas colônias são de coloração alaranjada, medem entre 1 – 1,2 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos (0,1 a 0,2 mm de comprimento) e arredondados. A abertura atrial é pequena, algumas vezes se assemelhando a um tubo. Não há lingueta atrial. Geralmente, a faringe tem 9-7-7-6 fendas em cada fileira. Os órgãos torácicos laterais possuem formato de aba ou meia-lua, localizando-se na altura da 3ª fileira de fendas. Outras vezes, são circulares e não salientes. O processo muscular é curto, projetando-se na região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é longo e fino. O testículo é dividido em dois folículos, rodeado por 7 voltas do espermiduto.

As larvas são esféricas, não gemíparas, medindo de 0,5 – 0,6 mm de comprimento de tronco. A cauda descreve $\frac{3}{4}$ de volta ao redor do tronco. As papilas adesivas são equidistantes e possuem o pedúnculo fino e longo. Elas possuem quatro pares de ampolas ectodérmicas arredondadas. A vesícula sensorial (estatocito e ocelo) está presente na região posterior da larva. O ocelo é anterior ao estatocito. A faringe contém 9-7-6 fendas em cada metade de cada fileira.

Comentários. Esta espécie é bem comum em toda costa brasileira. Foi descrita por Lotufo & Dias (2007) para acomodar os espécimes inicialmente identificados como *D. lutarium* Van Name, 1910 no Brasil, cuja principal diferença é o maior tamanho da larva (0,8 mm tronco) e maior número de pares de ampolas (5). *D. galacteum* é muito similar a *D. duplicatum* na coloração da colônia e formato das espículas, porém estas espécies diferem na consistência da colônia, formato do órgão torácico lateral, tamanho da larva e número de pares de ampolas ectodérmicas na larva. *Didemnum duplicatum* possui uma colônia menos quebradiça, órgão lateral torácico com formato ondulado ou em raio geralmente 2 vezes o tamanho deste órgão em *D. galacteum* e larvas com 0,7-0,8 mm de comprimento e oito pares de ampolas.

Distribuição Geográfica. Localidade tipo: Brasil (Lotufo 2002, Lotufo and Dias 2007). Outras localidades: Guiana Francesa (Monniot, 2016).

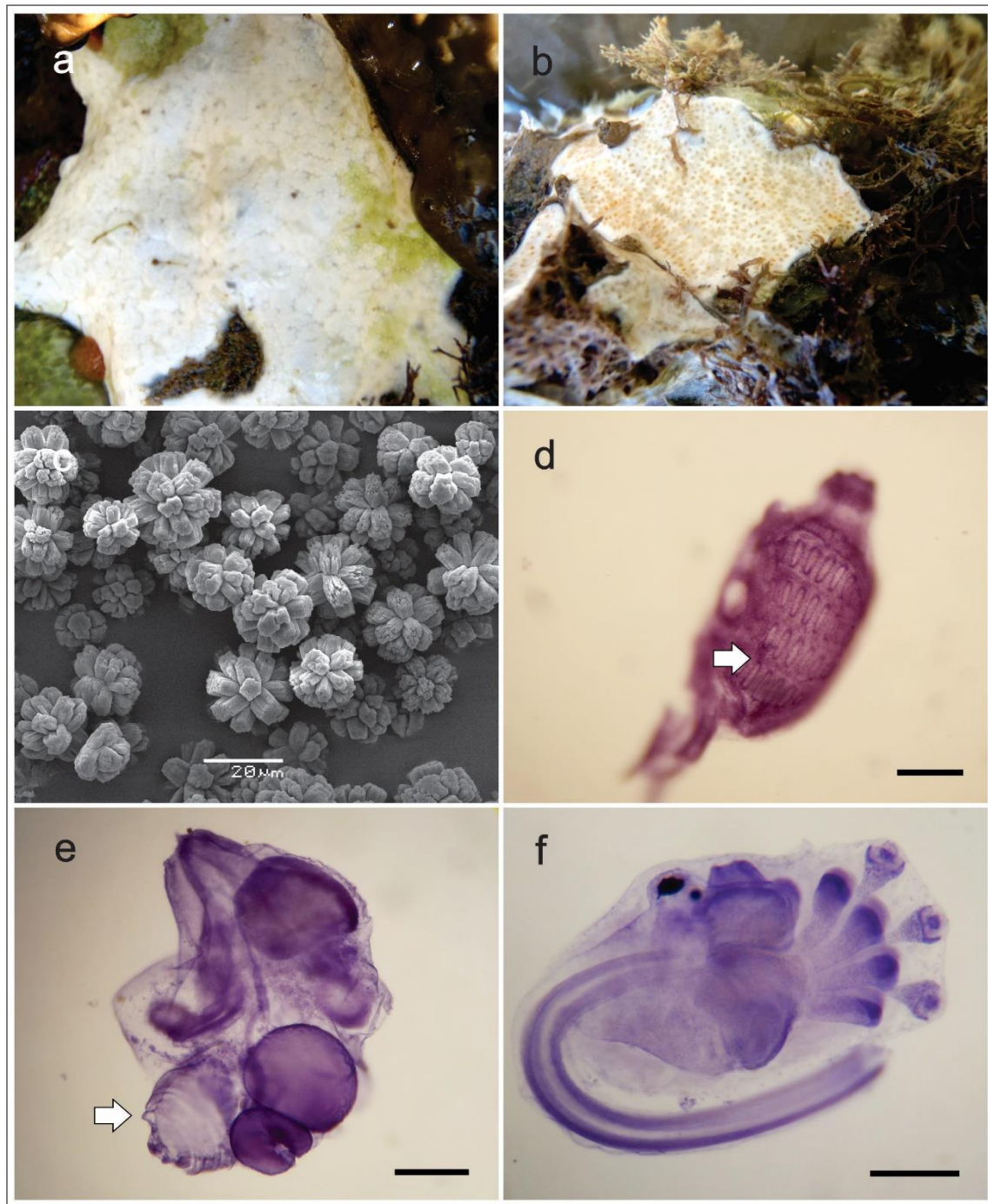


Figura 9. *Didemnum galacteum* Lotufo & Dias, 2007 – Brasil (Paraíba). a – b, colônias *in situ*. Na figura a, observa-se algas simbiotes. c, espículas. d, tórax, seta indicando o órgão torácico lateral. e, abdome com a seta indicando o testículo rodeado pelo espermiduto. f, larva. Escalas: 0,1 mm.

Didemnum sp. 1

(Figura 10)

Material examinado. DZUP DID-774, Recife Madagascar, Sisal, México (21°26'16" N, 90°16'39" W), 1 colônia, 13 m, 17/06/2015, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. A colônia apresenta coloração branca rosada *in situ*. O material analisado possui 2,5 cm de diâmetro e de 3 – 7 mm de espessura. A túnica é quebradiça com grande densidade de espículas, as quais estão distribuídas uniformemente em toda a colônia. As espículas são globulares e de dois tipos: sem raios e com raios rombudos com 6 – 8 raios em uma secção transversal; medem cerca de 20 µm de diâmetro. Esta espécie possui uma fina camada superficial de túnica sem espículas. Em cada abertura cloacal, este espécime possui uma estrutura que não foi possível de ser identificada. Parece que outro animal depositou ovos na superfície da colônia.

Os zooides são brancos, medem 1 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos longos e arredondados. A abertura atrial é pequena, algumas vezes se assemelhando a um tubo. Não há lingueta atrial. Os órgãos torácicos laterais estão localizados na altura da 3ª fileira de fendas e possuem formato circular e não são salientes. São bem pequenos, quase imperceptíveis. O processo muscular é maior que o abdome (1 mm de comprimento), projetando-se na região anterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é curto. O abdômen posiciona-se horizontalmente em relação ao tórax. A alça intestinal sobrepõe-se ao estômago. O testículo (diâmetro total 0,3 mm) possui dois folículos, globulares e grandes, rodeados por 9 voltas do espermiduto. Um ovócito grande e um pequeno estão presentes. As larvas são imaturas, porém medem cerca de 1 mm de comprimento de tronco.

Comentários. Diferentemente de *D. duplicatum*, este espécime possui o órgão torácico lateral em formato circular e muito pequeno, o pedúnculo esofágico-retal curto, processo muscular longo, projetando-se na região anterior do pedúnculo esofágico-retal. *Didemnum galacteum* diferencia-se de *Didemnum* sp.1 por colônias de coloração branca e larvas com 0.6 mm de comprimento de tronco.

Distribuição Geográfica. México, Sul do Golfo do México.

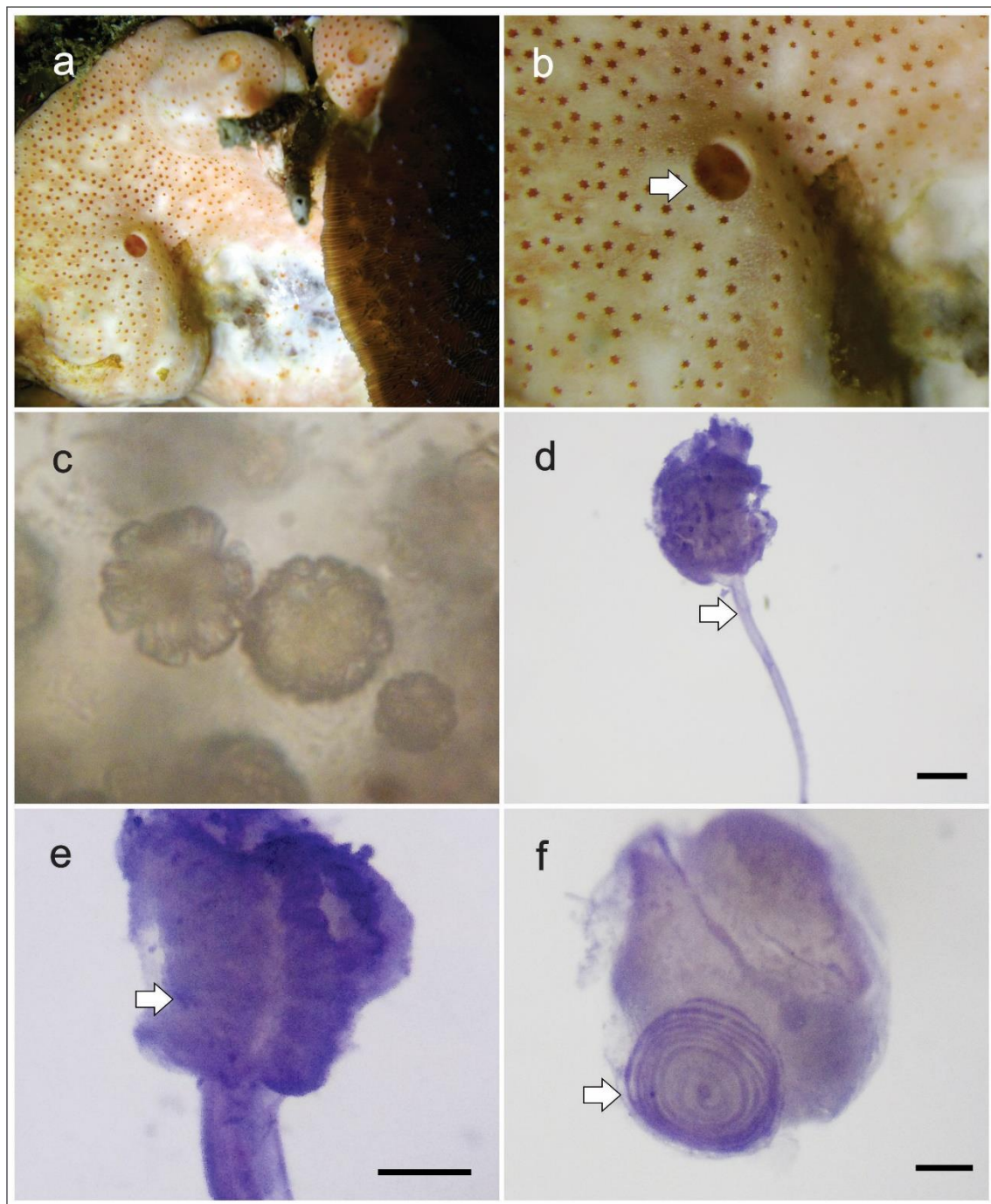


Figura 10. *Didemnum* sp.1 – México. a, colônia *in situ*. b, detalhe da superfície da colônia com a seta indicando a abertura cloacal. c, espículas em microscopia ótica. d, tórax. Seta indica o processo muscular. e, tórax, seta indica o órgão torácico lateral. f, abdome com a seta indicando o testículo rodeado pelo espermiduto (zooides e larvas corados com hematoxilina). Escalas: 0,1 mm.

Didemnum sp. 2

(Figura 11)

Material examinado. DZUP DID-776, Barco Hundido, Sisal, México (19°43'61" N, 90°47'89" W), 1 colônia, 3 m, 17/06/2015, *leg.* Rocha, R.M. DZUP DID-777, Barco Hundido, Sisal, México (19°43'61" N, 90°47'89" W), 1 colônia, 3 m, 17/06/2015, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. As colônias possuem de 5 a 10 cm de diâmetro por 1 mm de espessura. A túnica é quebradiça com grande densidade de espículas, as quais estão distribuídas uniformemente em toda a colônia. A superfície da colônia possui papilas que estão relacionadas ao sifão oral. As espículas são globulares com 8 raios rombudos, em uma secção transversal, medindo entre 15 – 30 µm de diâmetro.

Os zooides são brancos, medem 1 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos e pontiagudos. A abertura atrial é pequena. Os órgãos torácicos laterais estão localizados na altura da 4ª fileira de fendas, próximo à abertura atrial. Possuem formato de aba (circulares) e são salientes. O processo muscular é tão longo quanto o abdome, projetando-se na região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é longo. O abdômen posiciona-se horizontalmente em relação ao tórax. A alça intestinal sobrepõe-se ao estômago. O testículo possui dois folículos, rodeados 8 voltas do espermiduto.

As larvas não são gemíparas, medindo de 1 mm de comprimento de tronco. A cauda descreve $\frac{3}{4}$ de volta ao redor do tronco. As papilas adesivas são equidistantes com o pedúnculo fino e longo. Elas possuem oito pares de ampolas ectodérmicas alongadas. A vesícula sensorial (estatocito e ocelo) está presente na região posterior da larva. O ocelo é anterior ao estatocito.

Comentários. *Didemnum duplicatum* Monniot, 1983 se diferencia de *Didemnum* sp.2 por possui órgão torácico ondulado ou em formato de raio e larvas com 0,7-0,8 mm de comprimento de tronco; *D. galacteum* por possui colônias de coloração branca, órgão lateral em formato circular, as vezes tem formato de aba, e larvas com quatro pares de

ampolas, medindo 0,5-0,6 mm de comprimento de tronco. Por essas principais diferenças encontradas entre estas espécies e por conter uma combinação de características que estão presentes tanto em *D. duplicatum* e em *D. galacteum*, acredita-se que este espécime seja uma nova espécie.

Distribuição Geográfica. México, sul do Golfo do México.

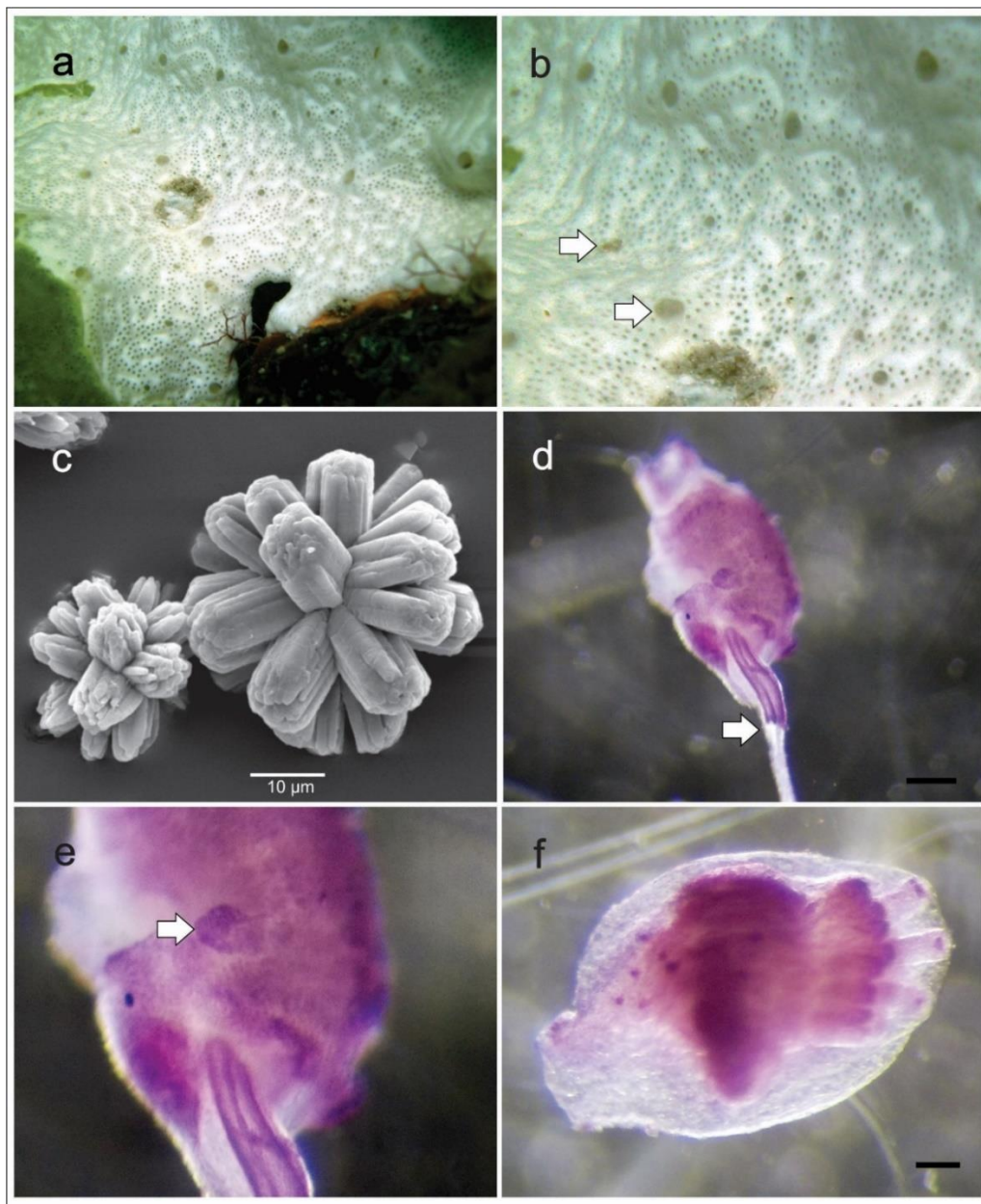


Figura 11. *Didemnum* sp. 2 – México. a, colônia in situ. b, detalhe da superfície da colônia com as setas indicando as aberturas cloacais. c, espículas. d, tórax. Seta maior indica a região de onde projeta-se o processo muscular. e, tórax, seta indicando o órgão torácico lateral. f, larva (zooides e larvas corados com hematoxilina). Escalas: 0,1 mm.

Didemnum sp. 3

(Figura 12)

Material examinado. DZUP DID-775 Barco Hundido, Sisal, México (19°43'61" N, 90°47'89" W), 1 colônia, 3 m, 17/06/2015, *leg.* Rocha, R.M.

Caracterização. A colônia apresenta coloração amarela *in situ*. O material analisado possui 3 cm de diâmetro e de 2 – 4 mm de espessura. A túnica é quebradiça com grande densidade de espículas, as quais estão distribuídas uniformemente em toda a colônia. As espículas são globulares com 6-8 raios cilíndricos em uma secção transversal, medindo cerca de 10 – 20 µm de diâmetro.

Os zooides são brancos, medem 1 mm de comprimento. O sifão oral possui seis lobos curtos e pontiagudos. A abertura atrial é pequena. Os órgãos torácicos laterais são alongados e ondulados, salientes e estão localizados na altura da 3ª fileira de fendas, próximo à abertura atrial. O processo muscular é tão longo quanto o abdome, projetando-se na região posterior do pedúnculo esofágico-retal. O pedúnculo esofágico-retal é longo. O abdômen posiciona-se horizontalmente em relação ao tórax. A alça intestinal sobrepõe-se ao estômago. O testículo possui dois folículos, rodeados 8 voltas do espermiduto. Larvas não estão presentes.

Comentários. Esta espécie diferencia-se das demais pela coloração amarelada da colônia e formato dos raios das espículas que são mais arredondados nas de maior tamanho em vez de extremidades planas como encontradas nas outras espécies. O formato alongado do órgão torácico lateral assemelha-se ao de *D. duplicatum*, mas a coloração da colônia e o formato das espículas são distintos.

Distribuição Geográfica. México, sul do Golfo do México.

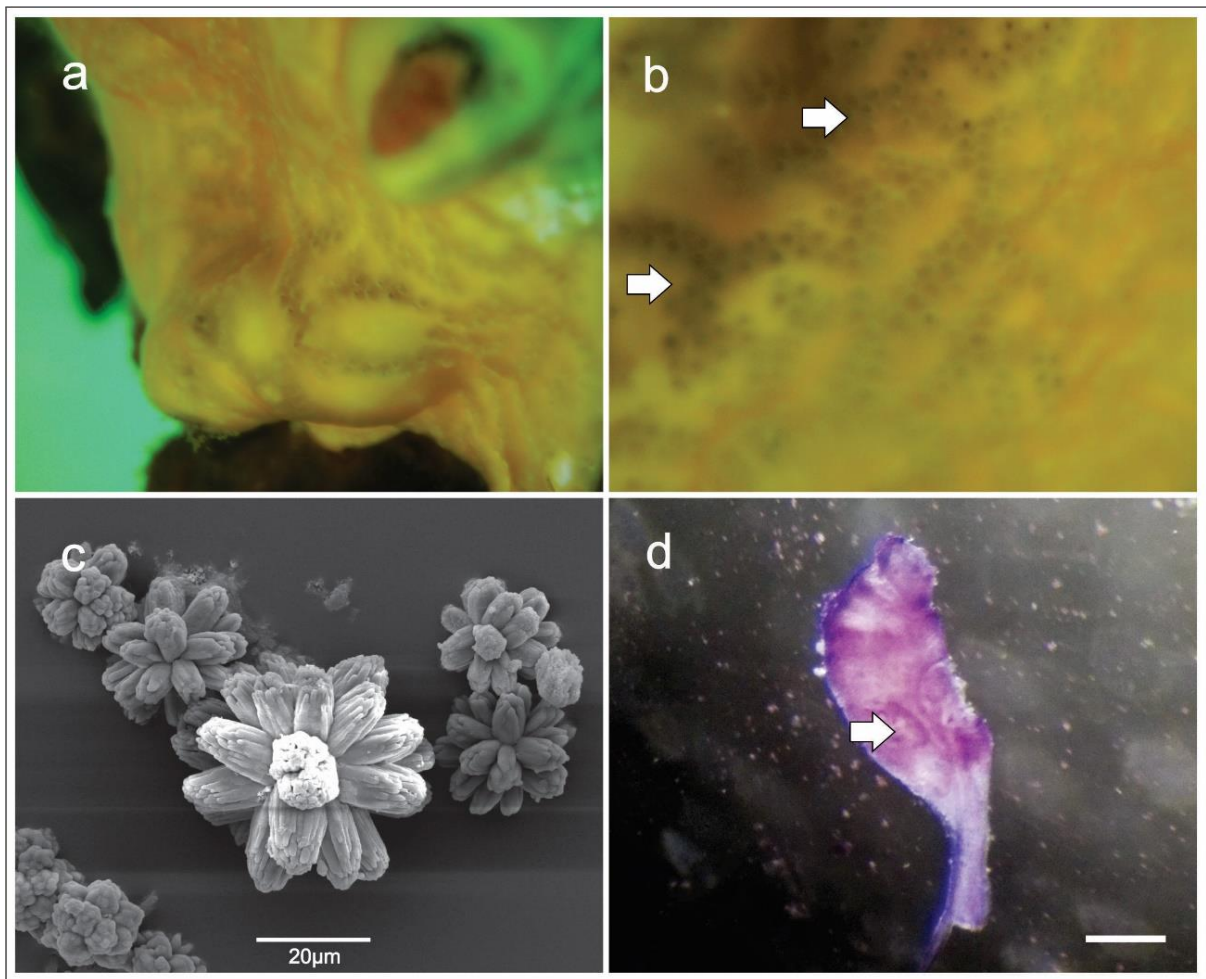


Figura 12. *Didemnum* sp.3 – México. a, colônia *in situ*. b, detalhes da superfície da colônia com as setas indicando as aberturas cloacais. c, espículas. d, tórax. Seta indica o órgão torácico lateral. Escala: 0,1 mm.

Didemnum sp. 4

Material examinado. DZUP DID-778, Barco Hundido, Sisal, México (19°43'61" N, 90°47'89" W), 1 colônia, 3 m, 17/06/2015, *leg.* Rocha, R.M.

Comentários. Apenas um pequeno fragmento de colônia foi dissecado (< 1 cm). Dessa forma, poucas características da colônia puderam ser definidas. A colônia possui menos de 1 mm de espessura e coloração branca. A túnica não é quebradiça e a cavidade

cloacal é ampla. Os zooides são fáceis de serem removidos e, possuem uma abertura atrial que expõe parte da faringe em vez de uma abertura mais fechada, como é observado nas demais espécies analisadas durante este trabalho. O órgão torácico lateral é circular, localizado na altura da 4ª fileira de fendas, próximo ao endóstilo. Gônadas não estão desenvolvidas e larvas não foram encontradas. Dessa forma, pela falta de estruturas desenvolvidas, esta espécie não pode ser descrita. No entanto, a combinação de características mostradas acima, como abertura atrial expondo a faringe e órgão torácico na altura da 4ª fileira de fendas, pode ser um indício de que este espécime represente uma nova espécie. Dessa forma, novos exemplares necessitam ser coletados para confirmar a identificação.

Distribuição Geográfica. México, sul do Golfo do México.

Discussão

O presente estudo mostrou um cenário de complexo de espécies revelando uma diversidade críptica. Os espécimes correspondem às espécies *D. duplicatum*, *D. galacteum*, *Didemnum* sp.1, *Didemnum* sp.2, *Didemnum* sp.3 e *Didemnum* sp. 4. As análises moleculares mostraram a prevalência de duas espécies crípticas em simpatria na costa brasileira ao menos no litoral central e nordeste e revelaram a existência de subclados tanto em *D. duplicatum* como em *D. galacteum*. Em *D. galacteum*, os espécimes do Nordeste formaram um dos clados, enquanto que os espécimes do Sudeste/Sul formaram o outro clado e estão como grupo-irmãos, no entanto, o ramo que suporta tão posição não possui um valor significativo de bootstrap e nem de probabilidade posterior. Dessa forma, as mutações acumuladas nas populações de *D. galacteum* sugerem rápida separação das linhagens, mesmo com a baixa divergência genética entre os espécimes de *D. galacteum* (< 4,3 %).

Entre os espécimes de *D. duplicatum* também foi encontrada uma baixa divergência genética (< 3,4 %), mostrando, neste caso, que não há evidências de que os clados internos observados sejam espécies distintas. Esta distância é comparável aos níveis de divergência intraespecífica obtidos em espécies e/ou gêneros de outros grupos como *Goniastrea aspera* (5,5%) em Echinodermata, *Othilia* (3,3 %), *Henricia* (3,2%) e *Echinaster* (<11%) (Lopes, Pérez-Portela *et al.*, 2016). A distância genética entre *D.*

duplicatum e *D. galacteum* foi de 21,6% para o gene COX1. Estes valores são altos se considerarmos a divergência média intergenética encontrada entre algumas espécies de *Didemnum* que é ao redor de 12%, como visto no capítulo anterior.

Os métodos de delimitação de espécies ABGD e BIN sugerem a existência de, pelo menos, seis grupos distintos em *D. duplicatum*, no entanto, a combinação de caracteres morfológicos encontrados não foi suficiente para separar estes clados. A análise morfológica de *D. duplicatum* revelou que os espécimes apresentam variabilidade na cor, densidade de espículas, bem como o formato do órgão torácico. O espécime dos Estados Unidos apresenta coloração rosada, órgão torácico lateral saliente e alongado, testículo duplicado com 7 voltas do espermiduto e larvas com 8 pares de ampolas ectodérmicas (Figura 2).

O clado formado por *Didemnum* sp. 1 apresenta algumas diferenças importantes que o separa dos demais exemplares aqui analisados como órgão torácico circular, pedúnculo esofágico curto e processo muscular projetando-se anteriormente ao pedúnculo e 8 voltas do espermiduto. *Didemnum* sp. 2 é grupo irmão de *Didemnum* sp. 3 com bons valores significativos (MV=71% e IB = 1) indicando que estes dois haplótipos representam duas espécies. Além do mais, a nova combinação de caracteres encontrada em *Didemnum* sp. 2 que sugere que este espécime deve ser descrito como uma nova espécie. Enquanto que em *Didemnum* sp. 3, a ausência de larva não permitiu que essa espécie fosse descrita adequadamente, assim prefere-se não definir este clado como uma nova espécie. *Didemnum* sp. 4 forma o grupo-irmão de *D. duplicatum*, suportado por valores significativos (MV = 100% e IB 1) e distância genética entre elas > 16%. *Didemnum* sp. 4 possui a colônia bem delicada e uma abertura atrial que expõe metade da faringe. Entretanto, nem gônadas e nem larvas estavam presentes na pequena amostra analisada (< 1 cm) para que a espécie fosse descrita. Dessa forma, sugere-se que novos exemplares sejam coletados em épocas distintas para realizar a devida caracterização da espécie.

Didemnum duplicatum possui distribuição desde a costa oeste dos Estados Unidos (Califórnia do Norte) até o sudeste do Brasil, sendo o estado do Espírito Santo, seu limite sul de distribuição. Assim como reportado por Monniot (2016) para a Guiana Francesa, as duas espécies *D. duplicatum* e *D. galacteum* também tem distribuição simpátrica na costa brasileira. É possível que o espécime reportado por Lambert *et al.* (2005) para o Texas se trate de alguma das espécies da região sul do Golfo do México aqui analisadas,

visto a diversidade de espécimes reveladas para o Golfo do México com a pequena amostragem analisada neste estudo. Dos espécimes de *D. duplicatum* reportados para o Caribe (Goodbody, 1984a, 2000, 2003), apenas os exemplares de Belize, Curaçao e Porto Rico tiveram sua identificação confirmada.

Além das espécies aqui estudadas, no Atlântico Oeste existe ainda *D. lutarium* com testículo dividido em dois folículos. Esta espécie diferencia-se pelas espículas estreladas e larvas com 0,8 mm de comprimento de tronco e cinco pares de ampolas ectodérmicas. Um próximo passo no estudo a evolução deste caráter seria reconstituir a filogenia de espécies com um e dois folículos para avaliar se a multiplicação dos folículos em espécies Atlânticas foi um evento único ou ocorreu várias vezes.

Referências

- Arribas, P., Andújar, C., Sánchez-Fernández, D., Abellán, P., & Millán, A. (2013). Integrative taxonomy and conservation of cryptic beetles in the Mediterranean region (Hydrophilidae). *Zoologica Scripta*, 42(2), 182–200. <https://doi.org/10.1111/zsc.12000>
- Cruz-Barraza, J. A., Carballo, J. L., Rocha-Olivares, A., Ehrlich, H., & Hog, M. (2012). Integrative taxonomy and molecular phylogeny of genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042049>
- Gama, P. B., Leonel, R. M. V., Hernández, M. I. M., & Mothes, B. (2006). Recruitment and colonization of colonial ascidians (Tunicata: Ascidiacea) on intertidal rocks in Northeastern Brazil. *Iheringia*, 96(2), 165–172.
- Goodbody, I. (1984a). Ascidians from Caribbean shallow water localities. *Studies on the Fauna of Curaçao and Other Caribbean Islands*, 203, 62–76.
- Goodbody, I. (1984b). The ascidian fauna of two contrasting lagoons in the Netherlands Antilles: Piscadera Baai, Curaçao, and the Lac of Bonaire. *Studies on the Fauna of Curaçao and Other Caribbean Islands*, 67(202), 21–61.
- Goodbody, I. (2000). Diversity and distribution of ascidians (Tunicata) in the Pelican Cays, Belize. *Atoll Research Bulletin*, 480, 303–333. <https://doi.org/10.5479/si.00775630.480>
- Goodbody, I. (2003). The Ascidian Fauna of Port Royal, Jamaica. I. Harbor and Mangrove dwelling species. *Bulletin of Marine Science*, 73(2), 457–476.
- Gutiérrez-Valencia, J., Gutiérrez, Y., & G. Dias, L. (2017). Species delimitation in the crypsis-defended and polymorphic stick insects of the genus *Libethra* (Phasmatodea, Diapheromeridae). *Zoologica Scripta*, 46(6), 693–705.

<https://doi.org/10.1111/zsc.12242>

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98. <https://doi.org/citeulike-article-id:691774>
- Heethoff, M., Laumann, M., Weigmann, G., & Raspotnig, G. (2011). Integrative taxonomy: Combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Frontiers in Zoology*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-8-2>
- Lambert, G., Faulkes, Z., Lambert, C. C., & Scofield, V. L. (2005). Ascidiaceae of south Padre Island, Texas, with a key to species. *Texas Journal of Science*, 57(3), 251–262.
- Lopes, E. M., Pérez-Portela, R., Paiva, P. C., & Ventura, C. R. R. (2016). The molecular phylogeny of the sea star *Echinaster* (Asteroidea: Echinasteridae) provides insights for genus taxonomy. *Invertebrate Biology*, 135(3), 235–244. <https://doi.org/10.1111/ivb.12135>
- Lotufo, T. M. C. (2002). *Ascidiaceae (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro*. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Lotufo, T. M. C., & Dias, G. M. (2007). *Didemnum galacteum*, a new species of white didemnid (Chordata: Ascidiaceae: Didemnidae) from Brazil. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 120(2), 137–142. [https://doi.org/10.2988/0006-324X\(2007\)120\[137:DGANSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2988/0006-324X(2007)120[137:DGANSO]2.0.CO;2)
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Monniot, F. (1983). Ascidiées littorales de Guadeloupe I. Didemnidae. *Bulletin Du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris*, 5A(1), 5–49.
- Monniot, F. (2016). Ascidiaceae (Tunicata) of the French Guiana Expedition. *Zootaxa*, 4114(3), 201–245. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4114.3.1>
- Pérez-Portela, R., Arranz, V., Rius, M., & Turon, X. (2013). Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. *Scientific Reports*, 3(3197), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep03197>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2013). A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>
- Razkin, O., Gómez-Moliner, B. J., Vardinoyannis, K., Martínez-Ortí, A., & Madeira, M. J. (2017). Species delimitation for cryptic species complexes: case study of *Pyramidula* (Gastropoda, Pulmonata). *Zoologica Scripta*, 46(1), 55–72. <https://doi.org/10.1111/zsc.12192>
- Rocha, R. M., Guerra-Castro, E., Lira, C., Pauls, S. M., Hernández, I., Pérez, A., ... Cruz-

- Motta, J. J. (2010). Inventory of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the National Park La Restinga, Isla Margarita, Venezuela. *Biota Neotropica*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000100021>
- Rocha, R. M., & Monniot, F. (1995). Taxonomic and ecological notes on some *Didemnum* species (ascidiacea, didemnidae) from São Sebastião Channel, South-Eastern Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, pp. 639–649.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stefaniak, L., Lambert, G., Gittenberger, A., Zhang, H., Lin, S., & Whitlatch, R. B. (2009). Genetic conspecificity of the worldwide populations of *Didemnum vexillum* Kott, 2002. *Aquatic Invasions*, 4(1), 29–44. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.1.3>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Vandepas, L. E., Oliveira, L. M., Lee, S. S. C., Hirose, E., Rocha, R. M., & Swalla, B. J. (2015). Biogeography of *Phallusia nigra*: Is It Really Black and White? *Biological Bulletin*, 228, 52–64.
- Weiss, A., & Melzer, R. R. (2012). Integrative taxonomy of Antarctic and Subantarctic sea spiders (Pycnogonida) using morphological and molecular methods. *Systematics and Biodiversity*, 10(3), 1–136. Retrieved from http://edoc.ub.uni-muenchen.de/16477/1/Weis_Andrea.pdf
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869–2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

Capítulo 4: *Polysyncraton* (Ascidacea: Didemnidae): a re-study of some type specimens and description of new species

LIVIA DE MOURA OLIVEIRA, BERT W. HOEKSEMA & ROSANA MOREIRA DA ROCHA

¹ Laboratório de Sistemática e Ecologia de Invertebrados Marinhos, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, CP 19020, 81531-980 Curitiba, Brasil.

² Naturalis Biodiversity Center, PO Box 9517, 2300 RA, Leiden, The Netherlands.

*E-mail: liviaoliveira@ufpr.br

Abstract

Polysyncraton Nott, 1892 is a genus in Didemnidae with 98 valid species, reported mostly from the Pacific Ocean. This genus is characterized by a large thorax, presence of atrial languet, lateral thoracic organ located at the anterior region of the thorax, three or more testis follicles surrounded by five or less coils of the sperm duct and larva with six or more pairs of ectodermic ampullae. Sixty-six specimens of *Polysyncraton* were analyzed, which are deposited in six collections. As a result of this effort, two new species are described, one is and 10 had their description complemented: *P. adelon* Monniot and Monniot, 2001, *P. amethysteum* (Van Name, 1902), *P. horridum* Monniot and Monniot, 2008, *P. lacazei* (Giard, 1872), *P. louminae* Monniot, 1984, *P. magnetae* Hastings, 1931, *P. magnilarvum* (Millar, 1962), *P. purou* Monniot and Monniot, 1987, *P. rostrum* Monniot and Monniot, 1997 and *P. trivolutum* (Millar, 1960). *Polysyncraton dentis* n. sp. has many papillae on the colony surface, stellate spicules with secondary rays coming out of the main rays, four testis follicles surrounded by three coils of the sperm duct, larval trunk 0.8-0.9 mm long and 12-14 adhesive papillae. *Polysyncraton cabofriense* n. sp. has cloacal apertures with four lobes, stellate spicules, three testis follicles surrounded by three coils of the sperm duct, gemmiparous larvae with 0.8-0.9 mm long trunk and 10 short pairs of adhesive papillae.

Key-words: Ascidacea, Tunicata, Atlantic Ocean, Pacific Ocean, Taxonomy.⁴

⁴ Capítulo formatado de acordo com a Revista Zoological Studies.

Polysyncraton was originally established to accommodate two species, *P. paradoxum* Nott, 1892 and *P. fuscum* Nott, 1892. These species have four rows of stigmata, an atrial languet and many testis lobes with spiral-shaped sperm duct. Sluiter (1909) was doubtful about the inclusion of some new species within *Polysyncraton* due to the combination of characteristics observed and suggested to exclude the atrial languet as diagnostic feature of *Polysyncraton* in order to accommodate the new species. Hartmeyer (1912) also emphasized the great variation of characters among species within *Polysyncraton*, such as the presence or not of an atrial languet, and characteristics shared with *Didemnum*, such as the number of testis lobes, and suggested that *Polysyncraton* should be reexamined.

Nowadays, the genus is characterized by species showing a large thorax, a large atrial languet, thoracic lateral organs that are usually located at the anterior region, more than three testis lobes, five or less coils of the sperm duct, larvae usually large, gemmiparous and with more than six pairs of ectodermic ampullae (Monniot et al. 1991; Kott 2001). Although many morphological characteristics of *Polysyncraton* are similar to those of *Didemnum*, the unique combinations of characteristics shown by both genera allows their taxonomic separation, and a recent molecular study also suggested this separation, although the support of those clades were not strong (Oliveira et al. 2017). The great species diversity within *Polysyncraton* results in many species being differentiated by subtle morphological differences, which are not well described in old literature. In an effort to complement the description of these species, many type specimens from several localities around the world were re-examined and two new species from the Atlantic Ocean were discovered among the samples.

Abbreviations

AMNH American Museum Natural History, New York, USA

DZUP Ascidiacea Collection of the Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Brazil

LIPY Tunicata Collection of Laboratório de Invertebrados Marinhos Paulo Young, Universidade Federal da Paraíba, Brazil

MNHN Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

NHM Natural History Museum, London

SMNH Steinhardt Museum of Natural History and National Research Center, Tel-Aviv University, Israel

USNM National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington DC, USA

ZMA Zoölogisch Museum of Amsterdam, now part of Naturalis Biodiversity Center, Leiden, The Netherlands

MATERIAL AND METHODS

A total of 66 samples representing 13 species of *Polysyncraton* were studied. A tabular key to identify species with the compilation of the observed characters was prepared (Table 1). Zooids and larva were measured following a pattern which can be observed in Figure 1. Transverse sections of various thickness were made in the colonies using a razor blade. The zooids and larvae were removed with microsurgery instruments under a Stereomicroscope model Zeiss Discovery V8 MS-163. They were stained with Harris hematoxylin and observed under a light microscope. For all colonies with a high density of spicules, hydrochloric acid (HCl) was used to decalcify the colony for easier dissection.

The zooids and/or larvae were dehydrated in three different grades of ethanol (70%, 80%, 90%), and butyl-ethanol during one minute in each stage. Then they were mounted on a slide with a Euparal or Durcuplan resin, covered with a cover slip, placed on a slide dryer for approximately two months for drying. The structures of the zooids and larvae were measured and photographed with a Differential Interference Contrast (DIC) microscope (Zeiss Axio Scope) coupled to a camera (A1 AxioCam MRc).

Scanning electron microscope (SEM)

A small sample of each colony (~25 mm²) was incinerated individually in a flame from an ethanol lamp to remove the tissue and was put into a melting pot containing undiluted household bleach for 5 min to remove remaining tissues. The bleach was carefully removed with a pipette and the spicules washed four or five times with water to remove dirt from the substrate or fecal pellets present in the tunic. Then, a drop of spicules was poured on a small piece of copper tape fixed to the SEM stub and covered in Quick Carbon Coater SC-701C for analysis under a JEOL JSM-6480LV scanning electron microscope in Naturalis Biodiversity Centre, Leiden. The remaining material was stored in an Eppendorf tube containing 70% ethanol. Part of the samples were covered in gold and analyzed under a JEOL JSM-6360-LV at Universidade Federal do Paraná.

Table 1. Identification key of the *Polysyncraton* species observed in this study.

1. **Colour of living colony:** B – brownish, BGr – brownish green, Dp – Dark purple, Dr – dark red, G – grey, Gp – greyish-pink, Gr – green, Or – orange-red, P – purple, Rp – rose purple, Y – yellowish, W – white
2. **Colony surface:** S – smooth, P – with papillae
3. **Density of spicules in the colony:** L – low density, S – mainly on the colony surface, A – abundant in whole tunic
4. **Shape of spicules:** G – globular, S – stellate
5. **Size of the spicule (μm)**
6. **Zooid length (mm)**
7. **Pigmentation of zooid:** 0 – absent, P – present
8. **Atrial languet:** 0 – absent, P – present
9. **Shape of the atrial languet:** F – forked, Ft- flat tip, P – pointed, T – trifurcated
10. **Number of stigmata per row**
11. **Number of testis lobes**
12. **Number of coils of the sperm duct**
13. **Size of larval trunk (mm)**
14. **Number of pairs of ectodermal ampullae in larvae**
15. **Number of embryos in larva**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Species	
?		S	A	G	35	0.8 – 1	P	0	-	8-7-7-7	4	4	?	?	?	<i>P. adelon</i>
Dp,	P,	S	L, S	G	15 – 20	1 – 1.5	0	P	F,	9-8-8-7	3 – 5	3 – 4	0.8 - 1	8	2	<i>P. amethysteum</i>
Rp									Ft							
BGr		S	A	S	85	1.2 – 1.6	0	P	F	11-11-10-8	2	4 – 5	0.7 – 0.75	?	?	<i>P. horridum</i>
Dr, Rp		S	L	S	20 – 80	2	0	P	P, F	11-11-10-9	4 – 6	4 – 5	0.85	10 – 13	2	<i>P. lacazei</i>
G		S	A	S	35 – 40	1.9 - 2	0	P	P	8-8-8-7	2	4	0.9 – 1	10-12	1	<i>P. louminae</i>
?		S	A	G	20 – 30	1.5	0	P	P	10	5 – 7	1 – 2	0.86	8	1	<i>P. magnetae</i>
Gp		S	A	S	75	2	0	P	T	12-10-10-10	10-12	3 – 5	1.4	10-12	2	<i>P. magnilarvum</i>
?		S	A	S	30 -50	1	0	P	T	8-8-8-8	1-3	1 – 2	0.6	8	2	<i>P. purou</i>
Or		S	A	G, S	40	1 – 1.5	0	P	F	7-6-6-6	5 – 6	2	0.7	8 – 10	1	<i>P. rostrum</i>
W		S	A	S	20 – 40	2.5	0	P	P	9 – 11	3-5	4	1.5	8	1	<i>P. trivolutum</i>
?		P	A	S	40 – 60	1	0	0	-	12-12-11-9	4	3	0.9	12-14	1	<i>Polysyncraton</i> n. sp.1
Y		S	A	S	40	1	0	P	P	7-7-7-6	3	3	0.8 – 0.9	10	2	<i>Polysyncraton</i> n. sp.2
?		S	S	G	30	1.2	0	0	F	?	6 – 8	2 – 3	1 – 1.3	8	1	<i>Polysyncraton</i> n. sp. 3

? no information available; - not applicable

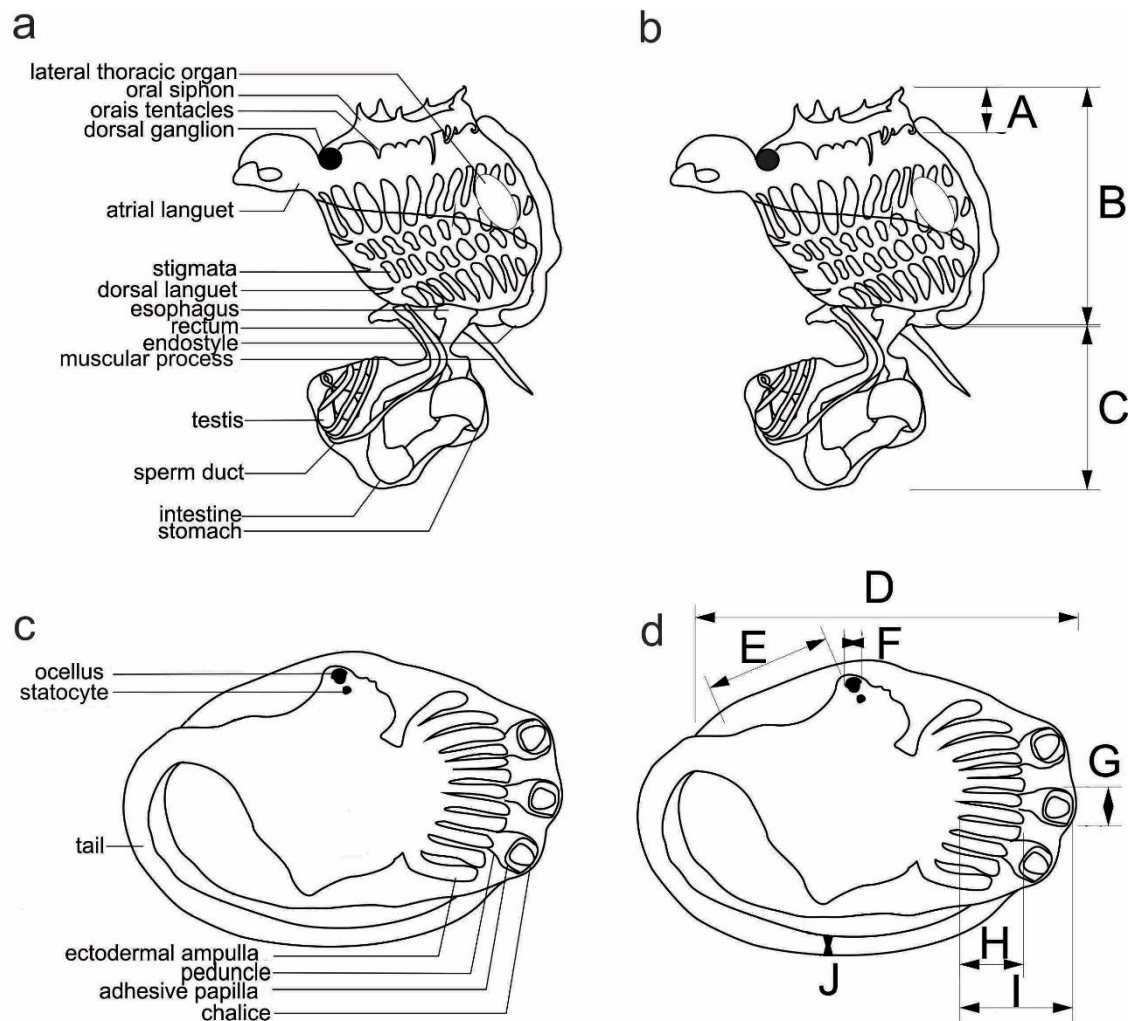


Figure 1. *Polysyncraton* morphology. Zooid (a-b) and larva (c-d) removed from the tunic. **a, c:** Zooid and larval characters **b, d:** Zooid and larval measurements. **A,** Length of the oral siphon. **B,** Length of the thorax. **C,** Length of the abdomen. **D,** Length of the larval trunk. **E,** Distance between the ocellus and the anterior region of the tail. **F,** Length of the ocellus. **G,** Diameter of the chalice of the central adhesive papillae. **H,** Length of the ectodermal ampullae. **I,** Length of the adhesive papillae. **J,** Width of the tail (at the level of the sensorial vesicle).

RESULTS

Order APLOUSOBRANCHIA Lahille, 1886

Family DIDEMNIDAE Giard, 1872

Genus *Polysyncraton* Nott, 1892

Polysyncraton adelon Monniot and Monniot, 2001

(Figure 2)

Polysyncraton adelon Monniot F. and Monniot C., 2001: 272; Kott 2005: 60, fig. 6B, 8B.

Examined material. MNHN A2-2037, one slide (holotype), Sonsorol Islands, Palau (5°20.88' N, 132°13.80' E), CRCHO004, 15 m depth, 24.07.1995.

Remarks. The slide studied was part of the type series and apart from the dark pigment cells observed at the anterior region of the stomach on the left side, all other characters agree with the original description of the species (Monniot and Monniot 2001b). Here we present pictures of the best zooids in the slide to complement published information about this species (Fig. 2).

Geographical distribution. Type locality: Palau (Monniot and Monniot 2001b). Other localities: Solomon Islands (Kott 2005).

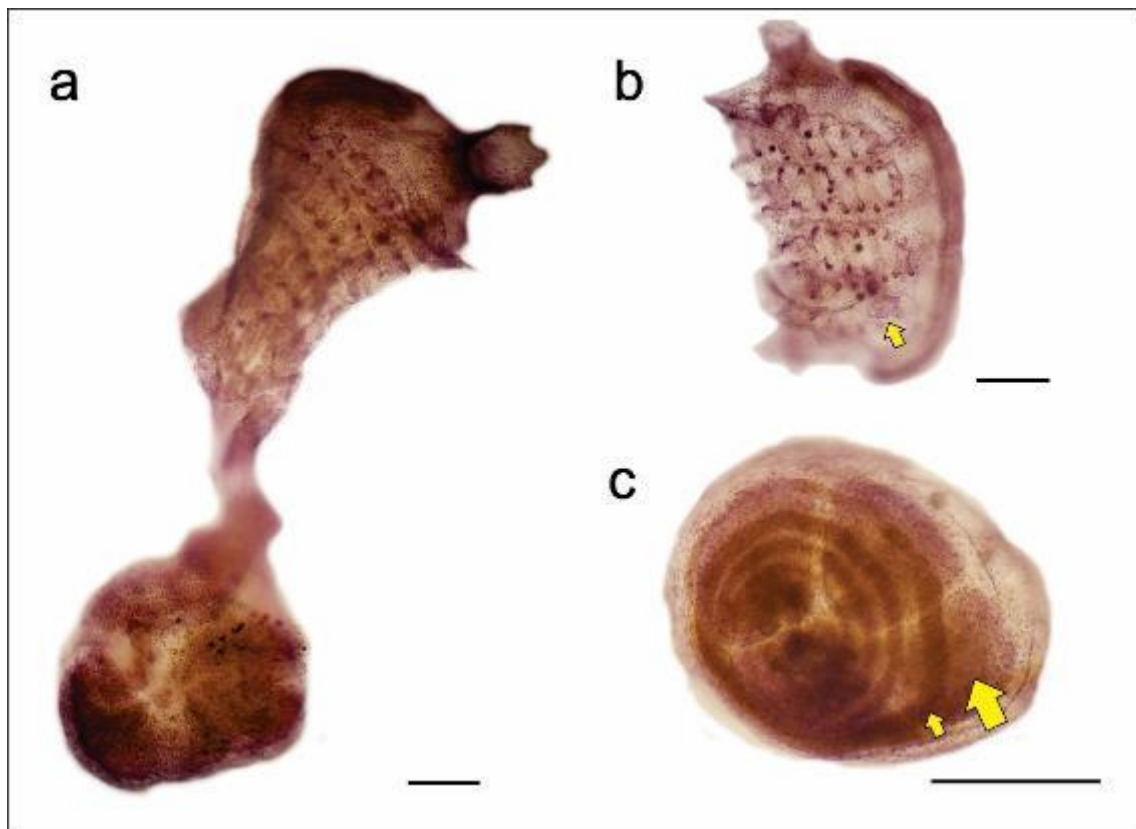


Figure 2. *Polysyncraton adelon* Monniot F. and Monniot C., 2001 – slide MNHN A2-2037. All structures stained with Hemalum. a, zooid. b, thorax, arrow indicating the lateral thoracic organ. c, testis with four lobes (large arrow) and sperm duct (small arrow). Scale bars: 0.1 mm.

Polysyncraton amethysteum (Van Name, 1902)

(Figures 3-6)

Polysyncraton amethysteum Van Name, 1902: 366, plate 54, figs. 62, 64-67; Rodrigues, 1962: 195; Millar, 1977: 200, fig. 21; Rocha *et al.*, 2005: 467; Lotufo and Silva 2006: 228; Monniot, 2016: 207, fig. 4D.

Didemnum (Polysyncraton) amethysteum: Van Name, 1921: 333, figs. 27-29; Van Name, 1945: 95, fig. 41, pl. 18, fig. 3; Moure *et al.*, 1954: 236; Millar, 1958: 499.

Examined material. AMNH 314, many colonies, United States of America, Florida, Biscayne Bay, *leg.* Van Name, W. G., 03.03.1916; UF 1127, two colonies, United States of America, Florida, Gulf of Mexico, St. Teresa (29°53'41.3" N, 84°33'23.4" W), Seagrass Beds, Sand, 2 m depth, 07.11.2011; UF 1037, one colony, United States of America, Florida, Gulf of Mexico, North of St. Petersburg (29°01'40.8" N, 83°35'19.3" W), 18-20 m depth, *leg.* Paulay, G., Bemis, M. and Evans, N. 12.03.2011; UF 1749, five colonies, United States of America, Florida, Gulf of Mexico, Hudson (28°21'05.4" N, 82°55'04.8" W), 6 m depth, 02.05.2011; NHM 1931.12.25.2, one colony, one slide, United States of America, Florida, Gulf of Mexico, Dry Tortugas, n° 23, *leg.* Tandy-Colman, 10.06.1931; USNM 17364, one colony, United States of America, Gulf of Mexico, off Florida (26°16'49" N, 82°44'01" W), 30.4 m depth, 19.07.1981; NHM 1914.5.18.103, one colony (type), Bermuda; AMNH 797, one colony, Puerto Rico, 10.07.1915; AMNH 798, one colony, Puerto Rico, 30.06.1915; NHM 1959.5.27.23-24 (7 colonies), Ghana, Elmira Gold Coast, *leg.* Irvine, F. R. and Foote, V.G., 11.10.1938; NHM 1937.1.5.1, one colony, Ghana, Elmira Gold Coast, *leg.* Plumptre, E.D., 28.12.1932; DZUP POSC-23, one colony, Brazil, Paraíba, Mataraca, Barra de Camaratuba, Mataraca (6°36'12" S; 34°57'51" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 13.03.2013; DZUP POSC-24, one colony, Brazil, Paraíba, Mataraca, Barra de Camaratuba, Mataraca (6°36'12" S; 34°57'51" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 13.03.2013; DZUP POSC-25, one colony, Brazil, Paraíba, Mataraca, Barra de Camaratuba, Mataraca (6°36'12" S; 34°57'51" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 13.03.2013; LIPY UFPB TUN-230, one colony, Brazil, Paraíba, Mataraca, Barra de Camaratuba (6°36'12" S; 34°57'51" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Projeto Biota Paraíba, 06.05.2008; LIPY UFPB TUN-395, one colony, Brazil, Paraíba, Rio Tinto, Barra de Camaratuba (6°36'12" S; 34°57'51" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 13.03.2013; DZUP POSC-13, one colony, Brazil,

Paraíba, Baía da Traição (6°41'15" S; 34°55'50" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 12.03.2013; DZUP POSC-14, one colony, Brazil, Paraíba, Baía da Traição (6°41'15" S; 34°55'50" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 12.03.2013; DZUP POSC-29, one colony, Brazil, Paraíba, Cabedelo, Quebramar Cabedelo (6°57'42" S; 34°50'34" W), 3-5 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 25.03.2013; DZUP POSC-30, one colony, Brazil, Paraíba, Cabedelo, Quebramar Cabedelo (6°57'42" S; 34°50'34" W), 3-5 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 25.03.2013; DZUP POSC-31, one colony, Brazil, Paraíba, Cabedelo, Quebramar Cabedelo (6°57'42" S; 34°50'34" W), 3-5 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 25.03.2013; LIPY UFPB TUN-397, one colony, Brazil, Paraíba, Cabedelo, Quebramar Cabedelo (6°57'42" S; 34°50'34" W), 3-5 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 25.03.2013; LIPY UFPB TUN-398, one colony, Brazil, Paraíba, Cabedelo, Quebramar Cabedelo (6°57'42" S; 34°50'34" W), 3-5 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 25.03.2013; LIPY UFPB TUN-176, one colony, Brazil, Paraíba, João Pessoa, Pomar das Esponjas, (07°08'04" S; 34°46'20" W), 3-5 m depth, *leg.* Projeto Biota Paraíba, 12.01.2009; DZUP POSC-15, one colony, Brazil, Paraíba, João Pessoa, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, PB (7°08'50" S; 34°47'51" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 28.03.2013; DZUP POSC-16, one colony, Brazil, Paraíba, João Pessoa, Ponta do Cabo Branco, João Pessoa, PB (7°08'50" S; 34°47'51" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Rocha, R.M., 28.03.2013; DZUP POSC-26, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Carapibus (7°16'19" S, 34°48'07" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 26.03.2013; DZUP POSC-27, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Carapibus (7°16'19" S, 34°48'07" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Rocha, R.M., 26.03.2013; [DZUP POSC-28, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Carapibus (7°16'19" S, 34°48'07" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Rocha, R.M., 26.03.2013; LIPY UFPB TUN-396, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Carapibus (7°16'19" S, 34°48'07" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 26.03.2013; DZUP POSC-18 one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho (7°19'14" S; 34°47'40" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Rocha, R.M., 27.03.2013; DZUP POSC-22, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho (7°19'14" S; 34°47'40" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Rocha, R.M., 27.03.2013; DZUP POSC-19, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho (7°19'14" S; 34°47'40" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Coll. Oliveira, L.M., 27.03.2013; DZUP POSC-20, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho (7°19'14" S; 34°47'40" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Coll. Oliveira, L.M., 27.03.2013; DZUP POSC-21, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho (7°19'14" S; 34°47'40" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 27.03.2013; LIPY UFPB TUN-153, one colony, Brazil, Paraíba, Conde,

Praia de Coqueirinho (7°19'14" S; 34°47'40" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Projeto Biota Paraíba, 03.06.2008; LIPY UFPB TUN-156, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho (7°19'14" S; 34°47'40" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Projeto Biota Paraíba, 03.06.2008; LIPY UFPB TUN-394, one colony, Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho (7°19'14" S; 34°47'40" W), 0-0.3 m depth, *leg.* Oliveira, L.M., 27.03.2013.

Complement of description. Due to the small size of the specimen NHM 1914.5.18.103 (Bermuda) belonging in the type series, a colony less than 1 cm, it has not been dissected. It has a gelatinous and transparent tunic, without spicules, through which zooids could be seen on the colony surface without a pattern of organization. The specimen from Biscayne Bay (AMNH 314) has a brownish colour in preserved material, it is also small (3 cm in diameter and 1 mm in thickness) with several cloacal apertures and a spicule layer on the colony surface. The zooids are brownish, and the atrial languet is bifurcated. The thoracic lateral organ is circular, protruding, at the level of the 2nd stigmata row. The abdomen has a glandular tissue. The testis has three lobes and four coils of the sperm duct. The specimen from Gulf of Mexico (USNM 17364 – Fig. 3) has the same characteristics of the specimens from Biscayne bay, except for it has four testicular lobes instead of three and the glandular tissue has not been observed. Other specimens from Gulf of Mexico (UF 1037, UF 1127 and UF 1749) have atrial languet flat-tip and testis with four lobes surrounded by five coils of the sperm duct. Larvae only were found in the sample UF 1749. Except of the size of them, they look like of those ones founded in the specimens from São Paulo State in Brazil. The specimens from Puerto Rico (AMNH 797 and AMNH 798) are similar in spicules density and zooid morphology with the samples from Gulf of Mexico.

The colonies from Ghana (NHM 1959.5.27.23-24 – Fig. 4) are small, less than 3 cm in diameter, the same size described by Van Name (1945) for American specimens. In contrast with information given about this sample by Millar (1953), the larvae have about 0.8 mm of trunk. The colonies are pinkish-purple, gelatinous, the tunic is smooth, shiny, marked with spicules accumulation in the oral siphons. The zooids measure 0.8-1.0 mm in length. The oral siphon has six short triangular lobes. The atrial aperture is small. The atrial languet is long and bifurcated, sometimes with a flat tip. The thoracic lateral organs are circular, not protruding and located in the anterior region of the thorax at the level of the 2nd row of stigmata, close to the atrial aperture. The pharynx has six

stigmata on each half of each stigmata row. The muscular process was not observed. The esophageal peduncle is short and wide. The abdomen is positioned horizontally in relation to the thorax. The secondary gut loop overlays the stomach. The testis is divided in five lobes surrounded by three coils of the sperm duct. The larvae are present on the colony surface. They are elliptical, gemmiparous, uncolored, measuring between 0.8-1.0 mm of trunk. A tail 350 μm in diameter winds about half the way around the trunk. Three adhesive papillae with a long and wide peduncle are close together. The chalice of the central adhesive papillae has 100 μm in diameter. There are six elongated ectodermal ampullae on each side. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) in the posterior region of the larval trunk. The ocellus is about 40 μm in length. The distance between ocellus and anterior region of the tail is 200 μm . Larva has two embryos, one dorsal and another ventral.

The morphological characteristics of the spicules and zooids of the Brazilian specimens are very similar to those observed by Van Name (1902), although variation in colony colour and spicule density is much larger in Brazil (Fig. 5). The colour varies from purple to brick. The colonies are 3-10 cm in diameter and 1-3 mm thick. The atrial languet can be with a flat tip or bifurcated. The pharynx has 8-8-8-7 stigmata on each half of each stigmata row. The thoracic lateral organ is circular, protruding, at the level of the 2nd stigmata row. The testis has 3-5 testis lobes, surrounded by 3-5 coils of the sperm duct. The larva is gemmiparous, with 0.6-0.8 mm of trunk. A tail 85-90 μm wide winds about three-quarters of the way around the trunk (Fig. 6). The peduncles of the adhesive papillae are long, while the chalice of the central adhesive papillae varies between 63-80 μm in diameter. There are eight pairs of ectodermic ampullae. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the mid-dorsal region of the larval trunk. The ocellus has a length of 56-60 μm . The distance between the ocellus and anterior region of the tail is 185-238 μm . The pharynx of the oozoid has 10-9-8 stigmata on each half row.

All the colonies from Brazil resemble the specimens described by Millar (1977) and Rodrigues (1962). According to Lotufo (2002), the Brazilian specimens differ from the one described by Van Name (1902) because of the different arrangement of spicules and organization of the zooids around a single cloaca per colony. However, the colonies studied by us showed much variation in colour and spicule density, as also observed by Pérèz (1949) and Millar (1953) in African specimens (Table 3). Lotufo mentions to have studied a sample from the type series and deposited in the American Museum of Natural

History with very large larvae (1.5 mm trunk length), but we were not able to find this sample in the museum collection. Unfortunately, all the other samples from Florida and surroundings did not have larvae. Monniot (2016) compared French Guiana with Bermuda specimens and concluded that they belong in the same species. Based on the variations encountered in all the colonies analysed we consider that they belong to the same species *P. amethysteum* including Brazilian samples.

Geographical distribution. Type locality: Bermuda (Van Name 1902). Other localities: United States, Florida (Van Name 1945), Puerto Rico, Cuba, Belize (Goodbody 2000), French Guiana (Monniot 2016), Brazil – Ceará to Santa Catarina (Moure *et al.* 1954; Millar 1958, 1977; Rodrigues and Rocha 1993; Rodrigues *et al.* 1998; Lotufo 2002; Lotufo and Silva 2006; Gama *et al.* 2006; Rocha *et al.* 2012), Cape Verde, Senegal, Ghana (Pérès 1948, 1949; Millar 1953; Monniot and Monniot 1967).

Polysyncraton horridum Monniot F. and Monniot C., 2008
(Fig. 7)

Polysyncraton horridum Monniot F. and Monniot C., 2008: 816, figs. 25-26, 75A.

Examined material. MNHN A2-2118, A2-2120, A2-2179 3 slides, Toachel Mid, Koror-Babeldaob channel, Palau (7°20.114'N, 134°31.03'E), OCDN6281-M, 6-33 m, leg. Colin, P.L.

Complement of the description. In some zooids, the thorax can measure about 1.3 mm in length. The pharynx has 11-11-10-8 stigmata in each row. The secondary gut loop partially overlays the stomach. The abdomen is positioned horizontally in relation to the thorax. The larvae are spherical and measure about 0.7-0.75 mm of trunk. It was not possible to discern if the larvae were gemmiparous or not. A tail 70 µm wide winds about three-quarters of the way around the trunk. There are three adhesive papillae close to each other. The chalice of the central adhesive papillae is 58 µm in diameter. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is in the mid-dorsal region of the larval trunk.

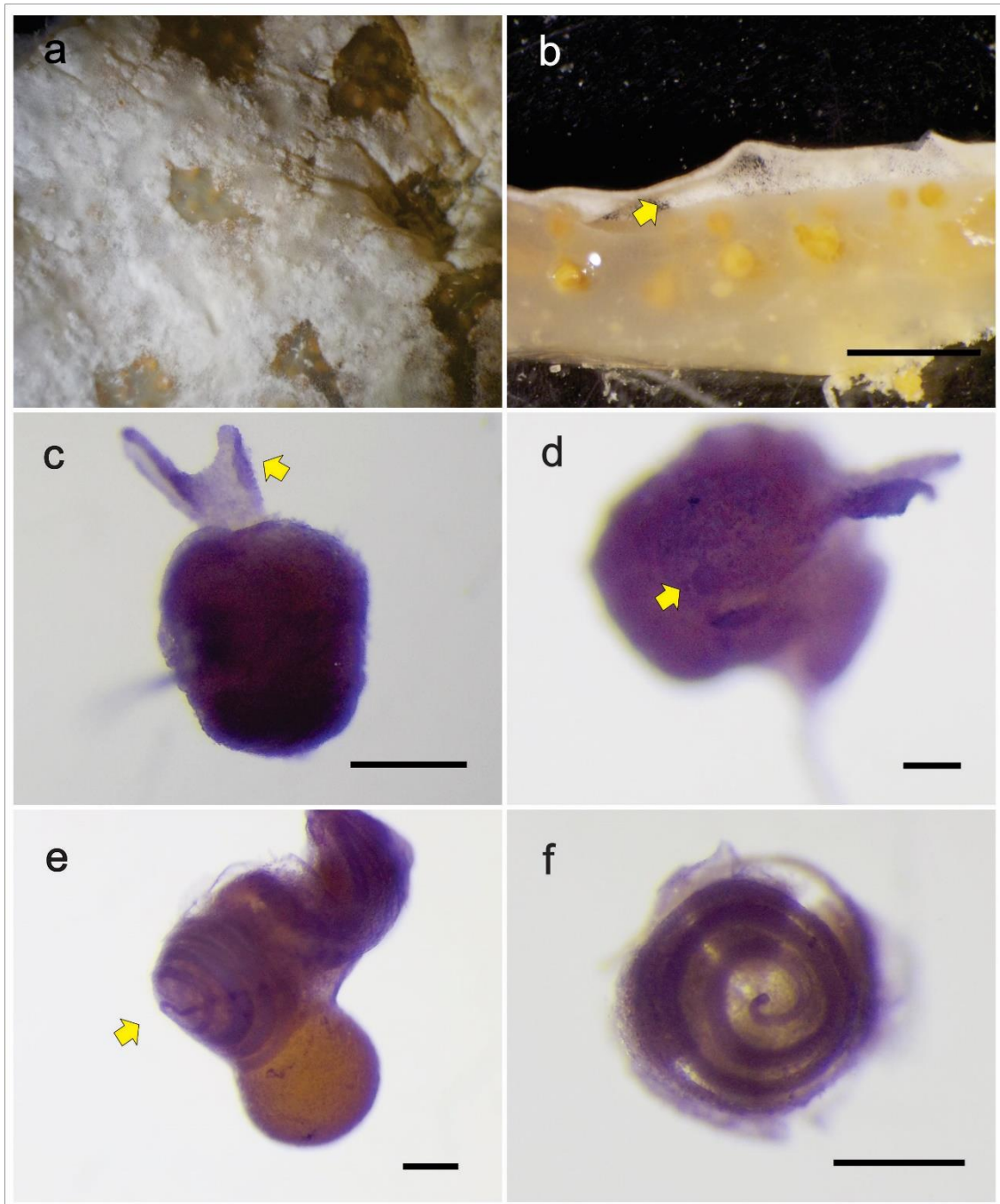


Figure 3. *Polysyncraton amethysteum* (Van Name, 1902) - Specimen from Florida USNM 17364. a, colony surface showing some areas without spicules. b, cross section of the colony showing the distribution of the spicules which are present mainly on the superficial layer (arrow). c, stained thorax, arrow indicates the atrial languet. d, stained thorax. arrow indicating the lateral thoracic organ. e, stained abdomen, arrow indicating the sperm duct with 5 coils. f, detail of the testis. Four lobes in a rosette and four coils of the sperm duct. Scale bars: b: 1 mm. c-f: 0.1 mm.

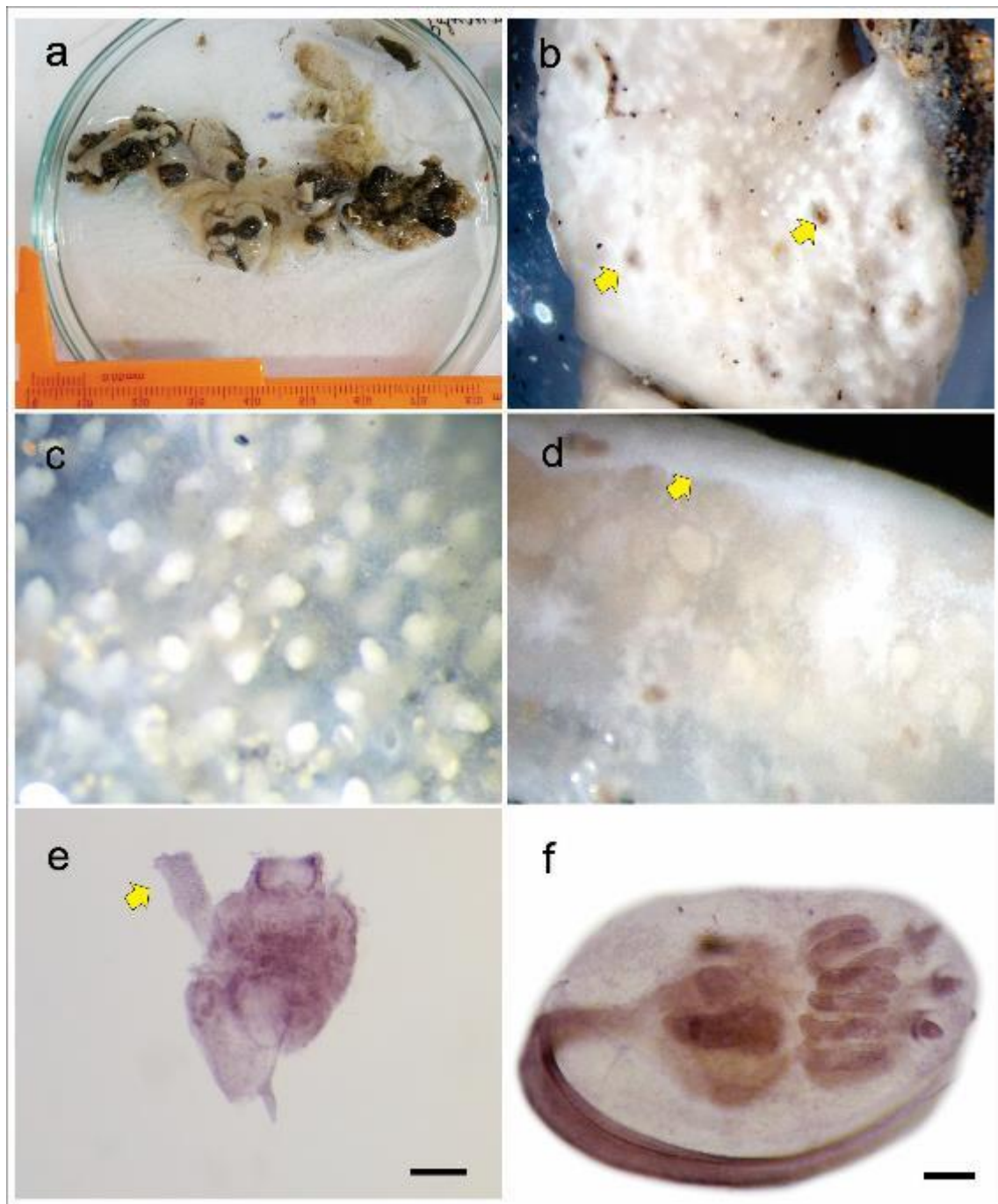


Figure 4. *Polysyncraton amethysteum* (Van Name, 1902). Specimen from Ghana NHM 1959.5.27.23-24. a, several small colonies preserved in formalin. b-c, detail of the colony surface. The pictures above show the variability of the distribution and density of spicules in tunic. d, cross section of the colony showing the distribution of the spicules. Arrow indicates a high concentration on the superficial layer. e, stained thorax. Arrow indicates the atrial languet. f, stained larva. Scale bars: 0.1 mm.

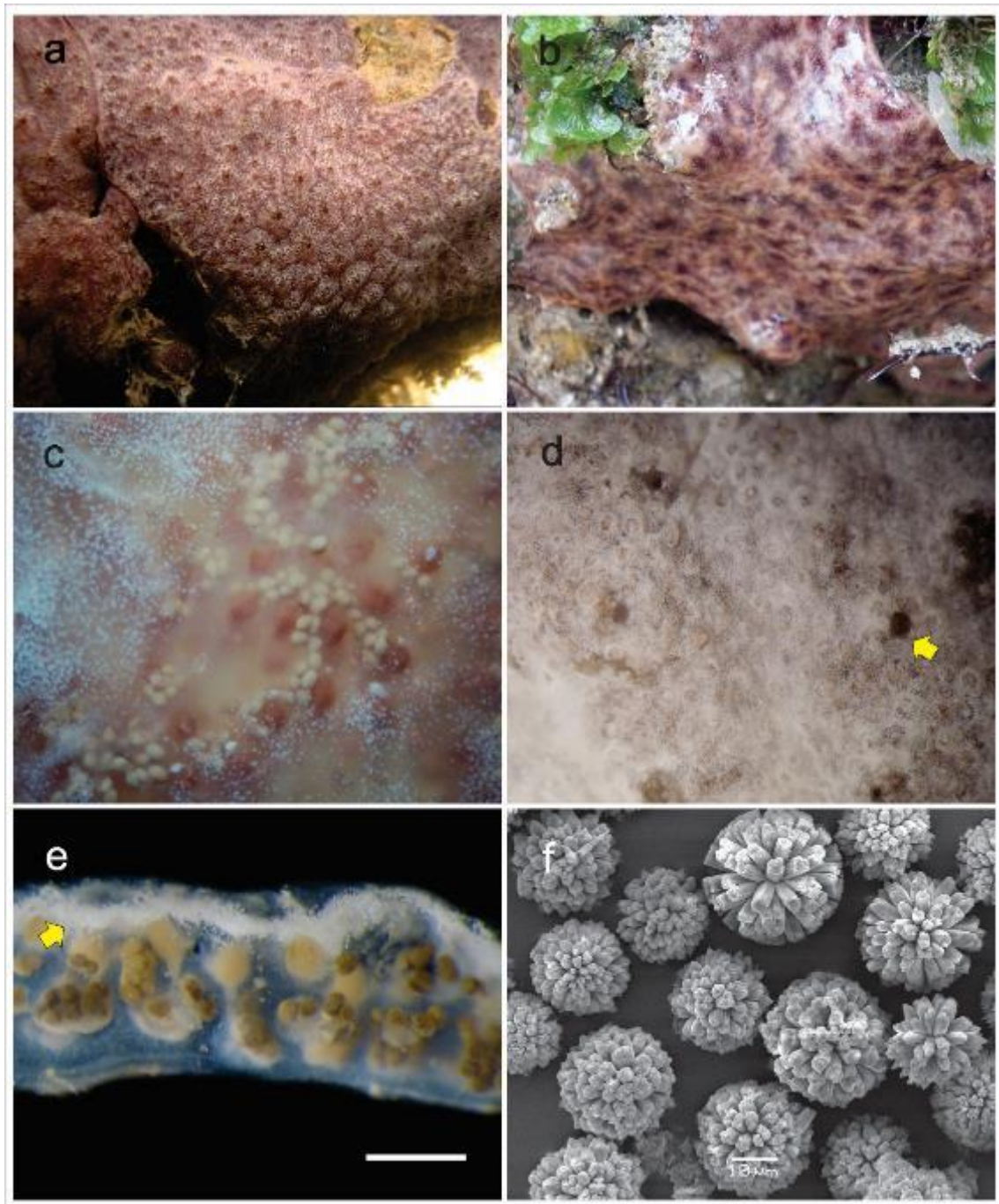


Figure 5. *Polysyncraton amethysteum* (Van Name, 1902). a-b, colonies *in situ* in Paraíba State. c-d, colony surface detail. Those photos show how spicules density can vary among the colonies (arrow indicates the cloacal cavity). e, cross section of the colony (arrow shows a thin layer of spicules distributed mainly on the colony surface). f- spicules. Scale bars: e = 1 mm.

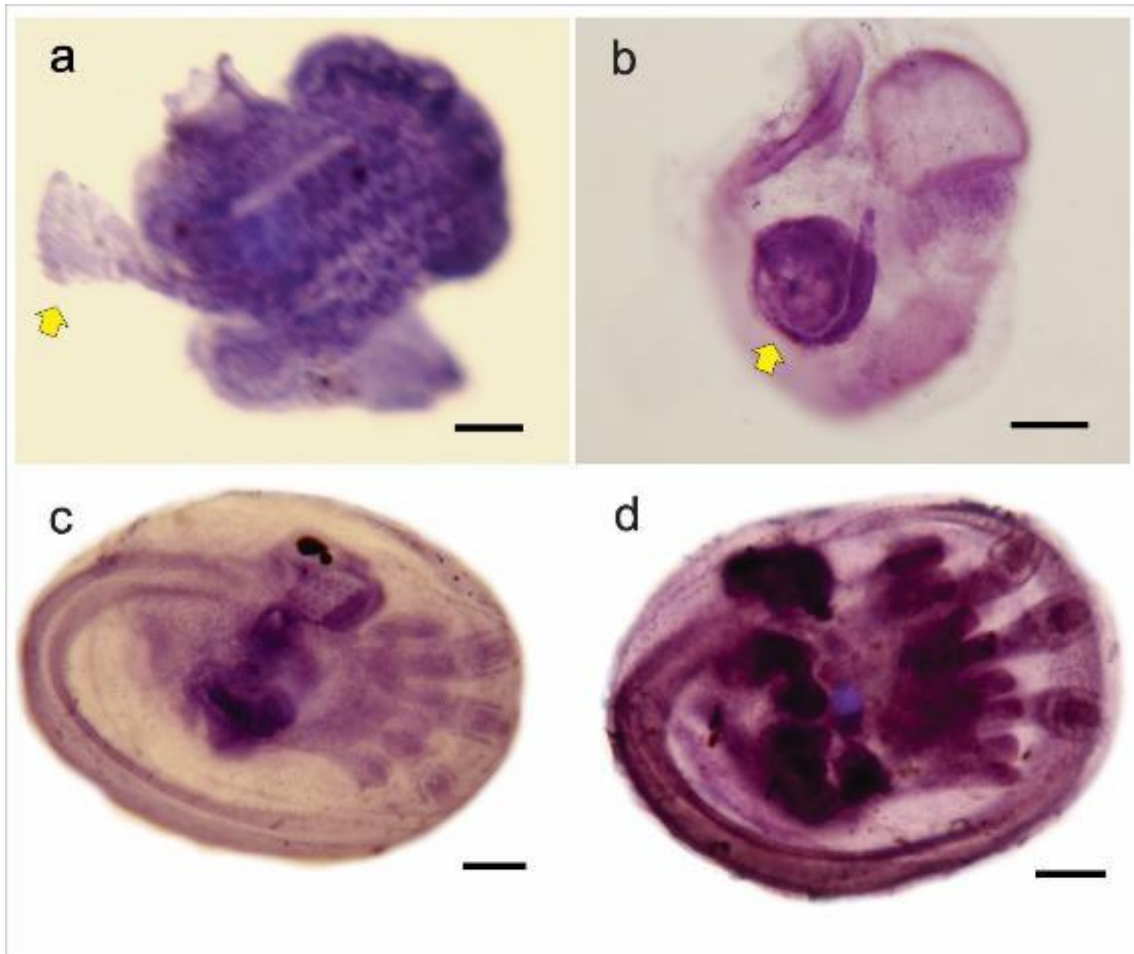


Figure 6. *Polysyncraton amethysteum* (Van Name, 1902) from Brazil. All structures stained with Hemalum. a, thorax showing the atrial languet (arrow). b, abdomen showing the position of the testis (arrow). c-d, larvae in Brazilian specimens from São Paulo (c) and Paraiba (d) states. Scale bars: 0.1 mm.

The ocellus is 28 μm in length. The distance between the ocellus and anterior region of the tail is 247 μm .

Geographical distribution. Only known from its type locality, Palau in the West Pacific (Monniot and Monniot 2008).

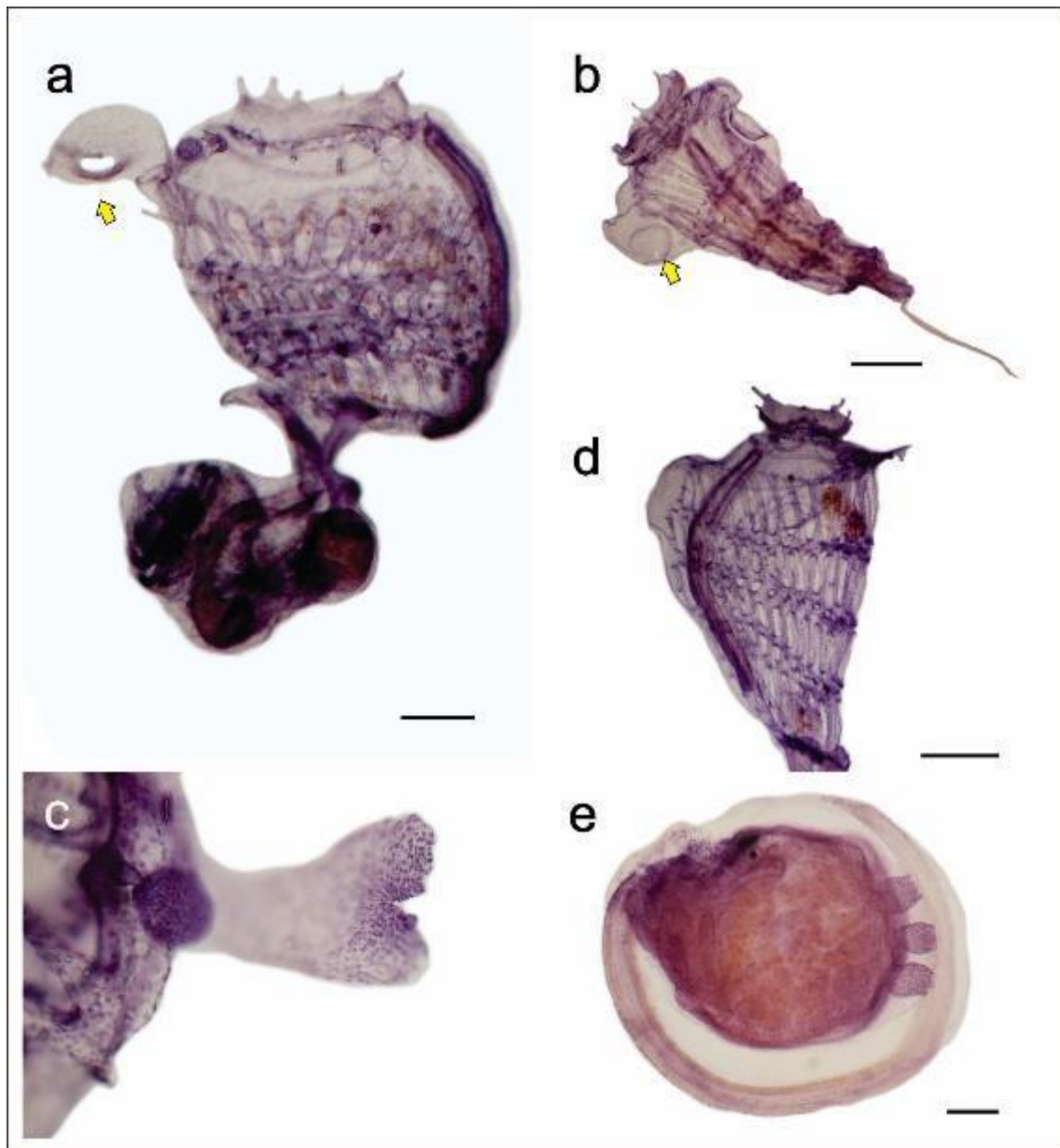


Figure 7. *Polysyncraton horridum* Monniot F. & Monniot C., 2008 – slides MNHN A2-2120 (zooid) and slide MNHN A2-2179 (thorax and larva) with stained structures. a, zooid (arrow indicates atrial languet). b, thorax with thoracic lateral organ (arrow). c, atrial languet. d, thorax. e, immature larvae. Scale bars: 0.1 mm.

Polysyncraton lacazei (Giard, 1872)

(Figure 8)

Leptoclinum lacazei Giard, 1872: 153, pl. 26, fig.3; pl.22, fig. 12.

Leptoclinum perspicuum: Lahille, 1890: 85.

Diplosomoides lacazii: Lahille, 1890: 129. Figs. 71-76.

Polysyncraton lacazei: Pérès 1956: 281; 1957: 183; 1958: 157; 1959: 302; Lafargue, 1968: 398; 1975:138; 1983: 379; Lafargue and Tursi 1975: 41; Lafargue and Wahl, 1987: 11, fig. 3 g-i, pl. 1b, pl. 6a-c, pl. 9 b1, c2; 1990: 389; Monniot 1969: 454; Médioni 1970: 40, pl. 5; Turon, 1985: 267, and synonymies.

Examined material. AMNH 863 (1 colony), Marseille (Mediterranean), France. ZMA TU 836 (1 colony), Ile de Callot, Baie de Morleix, Brittany (East Atlantic), France. Roscoff, 1954, 1 slide, *leg.* Stock, J.H. 18.08.1954.

Remarks. The specimen analyzed did not show developed gonads or larvae. However, the characteristics of the colony correspond with those described by Lafargue (1968) and Turon (1986), although Lafargue's specimens have spicules from 20-80 μm , while those in the present study measured 20-30 μm , with six short conical rays in transverse optical section. The muscular process is shorter than or as long as the abdomen, 0.4 mm in length, inserted in the middle of the esophageal peduncle. The secondary gut loop overlays the stomach. The abdomen is positioned perpendicularly to the thorax. The stolonial vessels are very short. Along the first intestinal loop there is a C-shaped structure that looks like glandular tissue.

Geographical distribution. Type locality: France (Giard 1872, Lahille 1890; Lafargue 1968, 1975, 1977, 1983; Lafargue and Wahl 1987, 1990; Médioni 1970; Pérès 1952). Other localities: Senegal (Lafargue and Wahl 1990; Monniot 1969), Spain (Pérès 1957, 1959; Turon 1985, 1986), Italy (Lafargue and Tursi 1975), Tunisia (Pérès 1956), Croatia (Lafargue 1971, 1981), Israel (Pérès 1958).

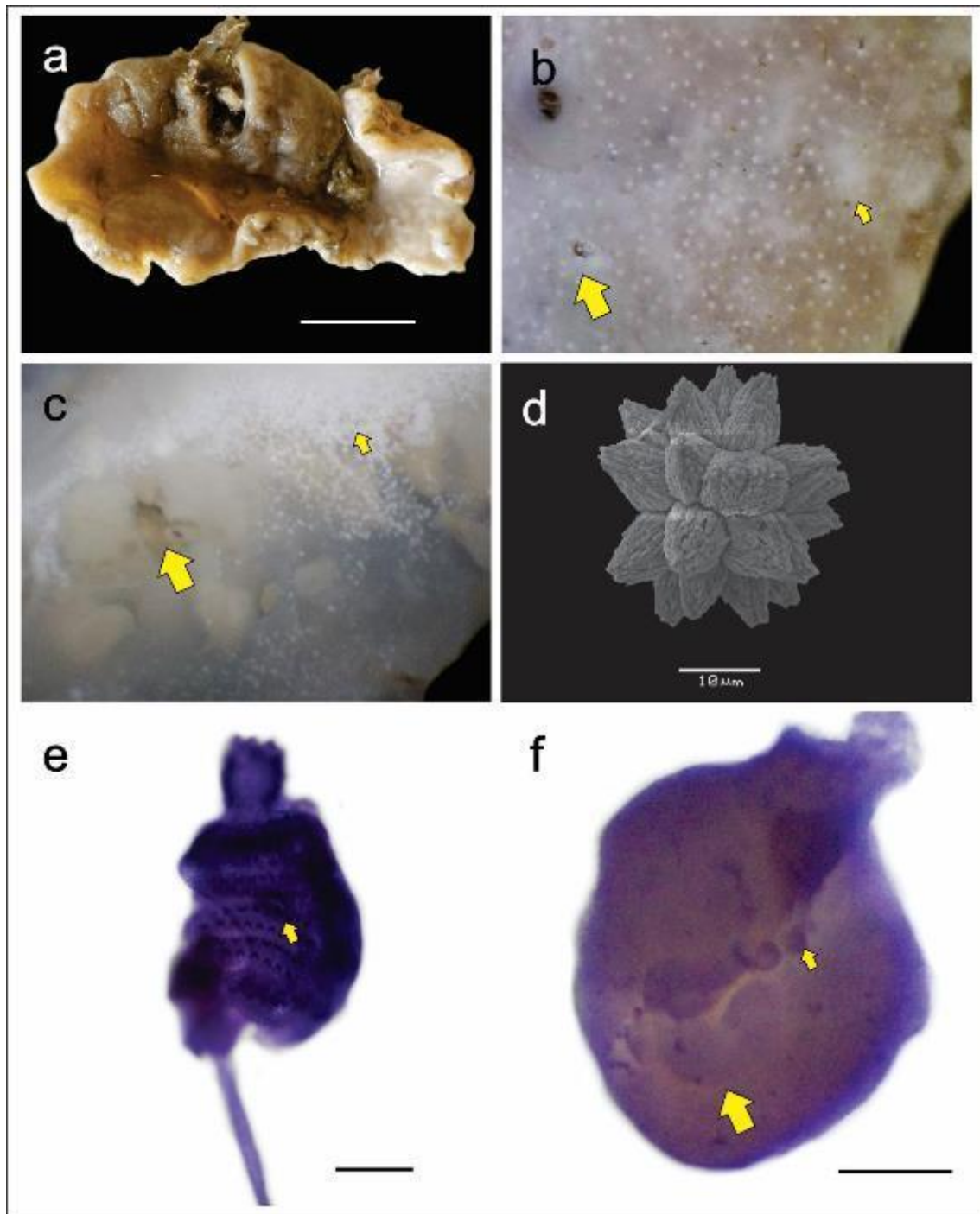


Figure 8. *Polysyncraton lacazei* (Giard, 1872). a, preserved colony. b, colony surface, big arrows indicate common cloacal apertures and small arrow to spicules grouped on the colony surface. c, cross section, big arrow indicates cloacal cavity and small arrow to region where spicules are abundant. d, spicules. e, stained thorax with thoracic lateral organs (arrow). f, stained abdomen (small arrow indicates stolonetic vessels and large arrow indicates glandular tissue). Scale bars: a = 1 cm, e-f = 0.2 mm.

Polysyncraton louminae Monniot, 1984

(Figure 9)

Polysyncraton louminae Monniot, 1984: 893, fig 3 a-d, pl. 1e.

Examined material. MNHN A2-446, A2-448 2 slides (holotype), Est du Sec à Cabrit, Guadeloupe (5°20.88'N, 132°13.80'E), CRCHO004, 3 m depth, 04.1983.

Remarks. The present species was only reported from Guadeloupe (Monniot, 1984). Except for the size of the larvae, which is a bit less than 0.9 mm of trunk, and the presence of bladder cells on its trunk, the characteristics of the zooids coincide well with the original description. The zooids are about 1.9 – 2.0 mm long. In the thorax, columnar cells project in the edge of the atrial aperture. The muscular process is about 0.4 mm long. The abdomen is perpendicular to the thorax. The secondary gut loop partially overlays the stomach. The larvae are almost spherical, not gemmiparous and measure 0.85 mm of trunk. A tail with a diameter of 81 µm winds half of the way around the trunk. Three adhesive papillae are close to each other and have short and thin peduncles. The chalice of the central adhesive papilla is 124 µm in diameter and its peduncle is 286 µm long. Ten to 12 elongated ectodermal ampullae are seen on each side of the larvae with lengths varying between 120 and 130 µm. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is located in the mid-dorsal region of the larval trunk. The ocellus is about 50 µm long. The distance between the ocellus and the anterior region of the tail is 302 µm.

Geographical distribution. Type locality: Guadeloupe (Monniot 1984).

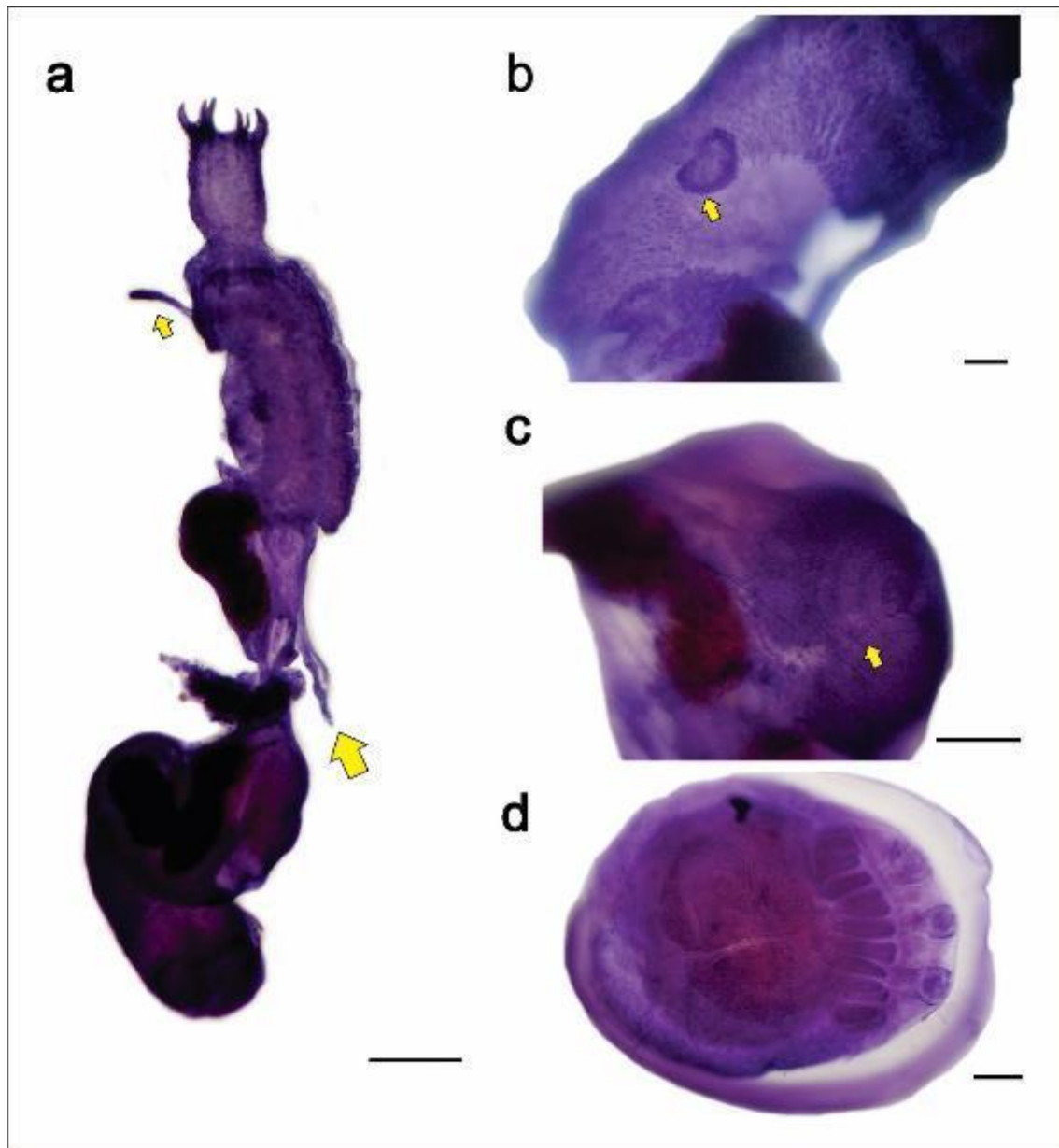


Figure 9. *Polysyncraton louminae* Monniot, 1984 2008 – slide MNHN A2-446. a, zooid. b, thorax, arrow indicating the lateral thoracic organ. c, testis with two lobes (small arrow indicates the sperm duct). d, larvae. Zooids and larva stained with hemalum. Scale bars: a = 0.2 mm, b-d = 0.1 mm.

Polysyncraton magnetae Hastings, 1931

(Figure 10)

Didemnum (Polysyncraton) magnetae Hastings, 1931: 100, fig. 15.

Polysyncraton magnetae: Kott 1962: 303; 2001: 109, figs 52, 162-I; 2007: 1172., fig. 7A.

Examined material. NHM 1930.12.17.46 one colony, 10 slides (part of type material), Great Barrier Reef Expedition 1928-1929, Stat. XXIII, mud and shell, 3 dredges, 12.03.1929.

Remarks. The morphological characteristics of the specimen NHM 1930.12.17.46 correspond with those in the original description (Hastings, 1931), except for the atrial languet. Hastings described it as large, while Kott (2001) did not mention it. In the slides analysed, the atrial languet is almost imperceptible in the slides. When present, the atrial languet is short and pointed, occasionally it is missing during dissection. The material was poorly preserved, but some characters still could be observed (Figure 10). The colony is spongy. The thoraces are visualized through the colony surface. The thorax is 1.0 mm long. The oral siphon has six lobes and measures 0.1 mm long. The atrial aperture is wide when the zooid is not contracted. The lateral thoracic organs are circular, protruding, located at the level of the first row of stigmata. The muscular process is longer than the abdomen and inserted at the middle of the oesophageal peduncle. The oesophageal peduncle is long and strait. The testis is divided in five lobes, sometimes six or seven, surrounded by two coils of the sperm duct. No larvae were observed in the present specimens and they are not known for this species (Kott 2001).

Geographical distribution. Type locality: the Turtle Group Isles, Great Barrier Reef Expedition St. XXIII, R/V “Magnet”, eastern Australia (Hastings, 1931).

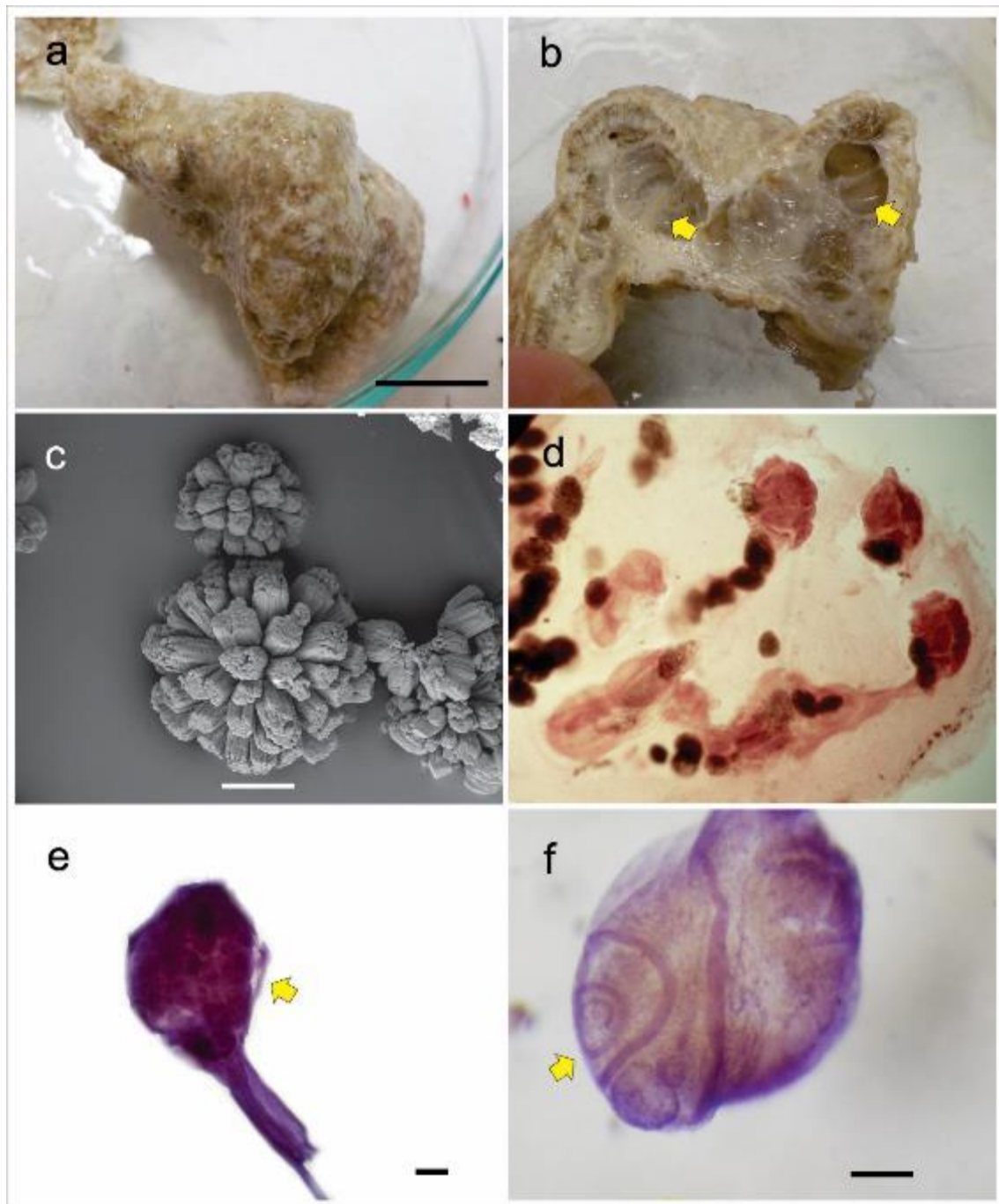


Figure 10. *Polysyncraton magnetae* Hastings, 1931 – Type specimen NHM 1930.12.17.46. a, preserved colony, b, cross section of the colony. Arrows indicate same cavities present on median region of the colony. c, spicules. d, cross section of a decalcified colony. e, ventral vision of the thorax (stained with Hemalum). Arrow shows the lateral thoracic organ. f, stained abdomen (arrow indicates the male gonad with sperm duct in spiral). Scale bars: a = 1 cm, c = 10 μ m, e-f = 0.1 mm.

Polysyncraton magnilarvum (Millar, 1962)

(Figure 11)

Didemnum (Polysyncraton) magnilarvum Millar, 1962: 165, fig. 25.

Examined material. MNHN A2-2466, A2-2767, A2-2470 (3 slides), South Madagascar.

Remarks. The species was reported from Mozambique, but the original description was published in the press posteriorly (Millar 1962). Kott (1975) synonymized it with *P. aspiculatum* Tokioka, 1949. Monniot & Monniot (2001a) confirmed that both species are different and described *P. aspiculatum* with globular spicules, the larvae with 1 mm of trunk and eight ectodermal ampullae on each side. Millar (1962) described *P. magnilarvum* with short atrial languet, testis with 8 to 10 lobes surrounded by 2½ coils of the sperm duct and larva with 30 ectodermic ampullae.

Examination of the slides revealed that the atrial languet is long, thin and trifurcated. The thoracic lateral organs are circular and not protruding, localized in the anterior half of the thorax at the level of the first row of stigmata, close to the endostyle. The muscular process is longer than the abdomen, up to 1.4 mm in length, inserted in the middle of the oesophageal peduncle. The abdomen is positioned perpendicularly to the thorax. The secondary gut loop does not overlay the stomach. The stoloniferous vessels are small and rounded. The testis is slightly below the gut loop, divided in 10 to 12 lobes, and surrounded by three or five coils of the sperm duct. The larvae are elliptical, gemmiparous and the trunk is about 1.4 mm long. A tail with a diameter of 104 µm winds half of the way around the trunk. The three adhesive papillae are close to each other with short peduncles. The chalice of the central adhesive papillae is 133 µm in diameter and the peduncle is 401 µm long. There are 12 to 15 elongated ectodermal ampullae on each side of the larva vary between 113 – 333 µm in length, depending on the developmental stage of the larvae. In larvae that are less developed, the ampullae can be between 113 and 143 µm long, while they are 279–333 µm in larvae that are well developed. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is located in the mid-dorsal region of the larval trunk. The ocellus is 57 µm long and the distance between the ocellus and the anterior region of the tail is 436 µm.

Geographical distribution. Type locality: Mozambique (Millar 1962). Other localities: South Madagascar (this study).

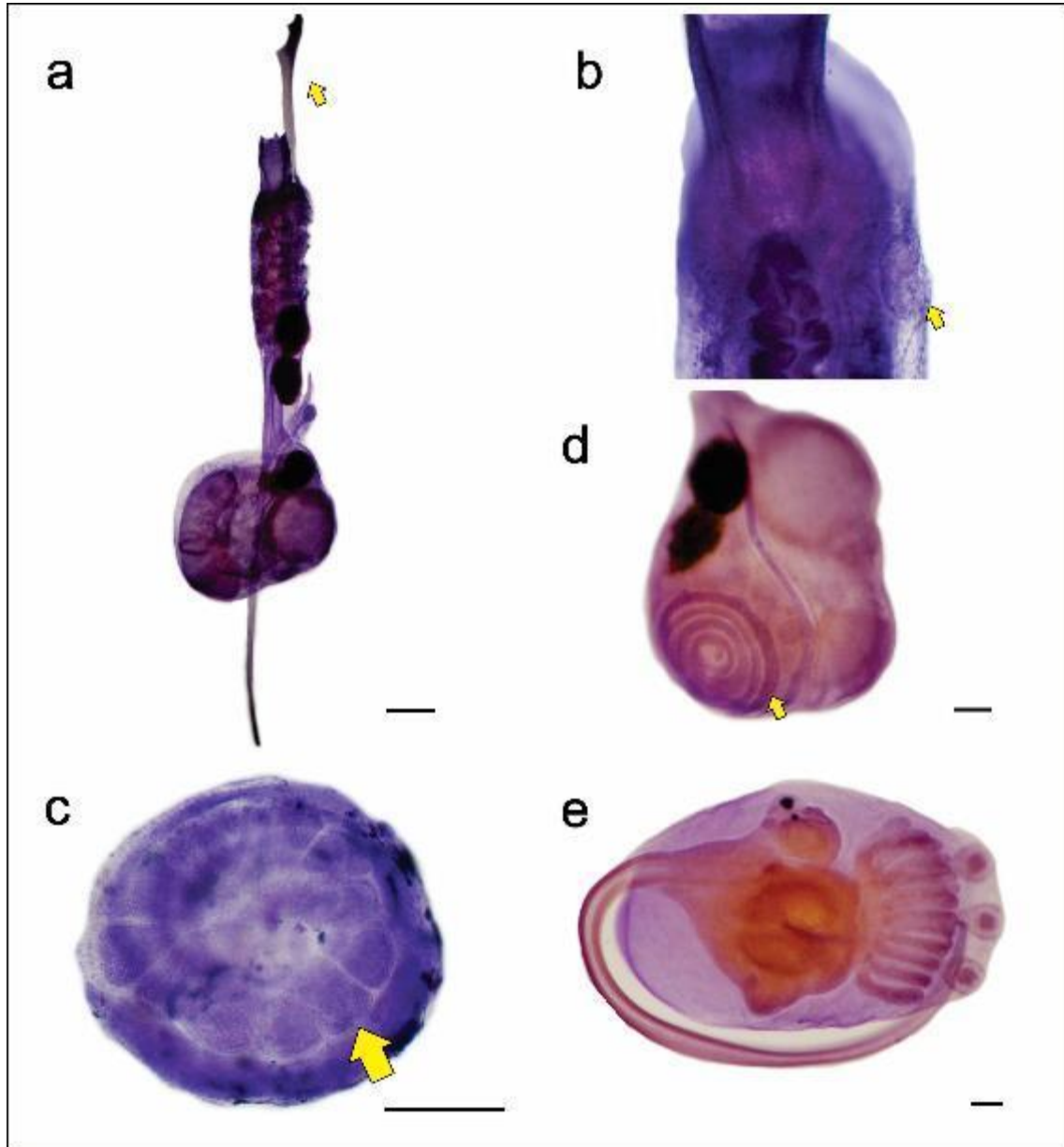


Figure 11. *Polysyncraton magnilarvum* (Millar, 1962) – slides MNHN A2-2466 (zooid) and MNHN A2-2467 (larva). a, zooid stained, arrow pointing the atrial languet. b, ventral view of the anterior region of the thorax, arrow indicating the lateral thoracic organ. c, testis lobes (arrow indicating one lobe). d, abdomen stained (arrow indicating the sperm duct). e, larva stained. Scale bars: a = 0.2 mm, c-d = 0.1 mm.

Polysyncraton purou Monniot C. and Monniot F., 1987

(Figure 12)

Polysyncraton purou Monniot C. and Monniot F., 1987: 49, fig. 16 d-h, pl. 3i; Monniot 1993: 11; Kott 2001: 126, figs. 60, 162C, pl. 6F; 2002: 33, fig. 12A-D; 2005: 2436, fig. 19D.

Examined material. MNHN A2-843, A2-846, A2-847 (3 slides), Tanzania.

Remarks. This species was described from French Polynesia by Monniot and Monniot (1987). All the characteristics correspond to the original description, but the testis in the studied slides have four to five lobes as was reported by Monniot (1993). The thoracic lateral organs are not protruding. The abdomen is positioned vertically in relation to the thorax. The secondary gut loop does not overlay the stomach. The larval trunk is 0.6–0.7 mm long instead of 0.55 mm long as the original description (Monniot and Monniot 1987). The larvae are gemmiparous. A tail with a diameter of 43 μm winds about three-quarters of the way around the trunk. There are three adhesive papillae close to each other with a long and thin peduncle. The chalice of the central adhesive papillae is 48 μm in diameter and the peduncle is 162 μm long. There are eight ectodermal ampullae on each side of the larvae whose lengths vary between 73 and 79 μm . The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is located in the mid-dorsal region of the larval trunk. The ocellus is about 33 μm long, while the distance between ocellus and anterior region of the tail is 182 μm .

Kott (2001) reported *P. purou* from Australia. Her specimens are bigger than the material analyzed in the present study and have some differences in number of testis lobes and size of the larva. The zooids are about 2 mm long, the atrial aperture is wide, and the testis are divided in five to eight lobes surrounded by three coils of the sperm duct, larvae 1 mm in length and ectodermal ampullae are more elongated than those ones analyzed during this study and described by Monniot and Monniot (1987). Monniot and Monniot (2001b) described *P. vestiens* from Palau as a different species from *P. purou*. They separated both species based on size of spicules, size of the atrial aperture and absence of the muscular process. However, their description is very similar to the original description of *P. purou* and to the characteristics of the zooids and larvae observed in the present study. So, it is possible that both *P. purou* and *P. vestiens* can be the same species.

Geographical distribution. Indo-West Pacific. Type locality: French Polynesia (Monniot and Monniot 1987). Further recorded from Australia (Kott 2001, 2002, 2005), New Caledonia (Monniot 1993) and Tanzania (this study).

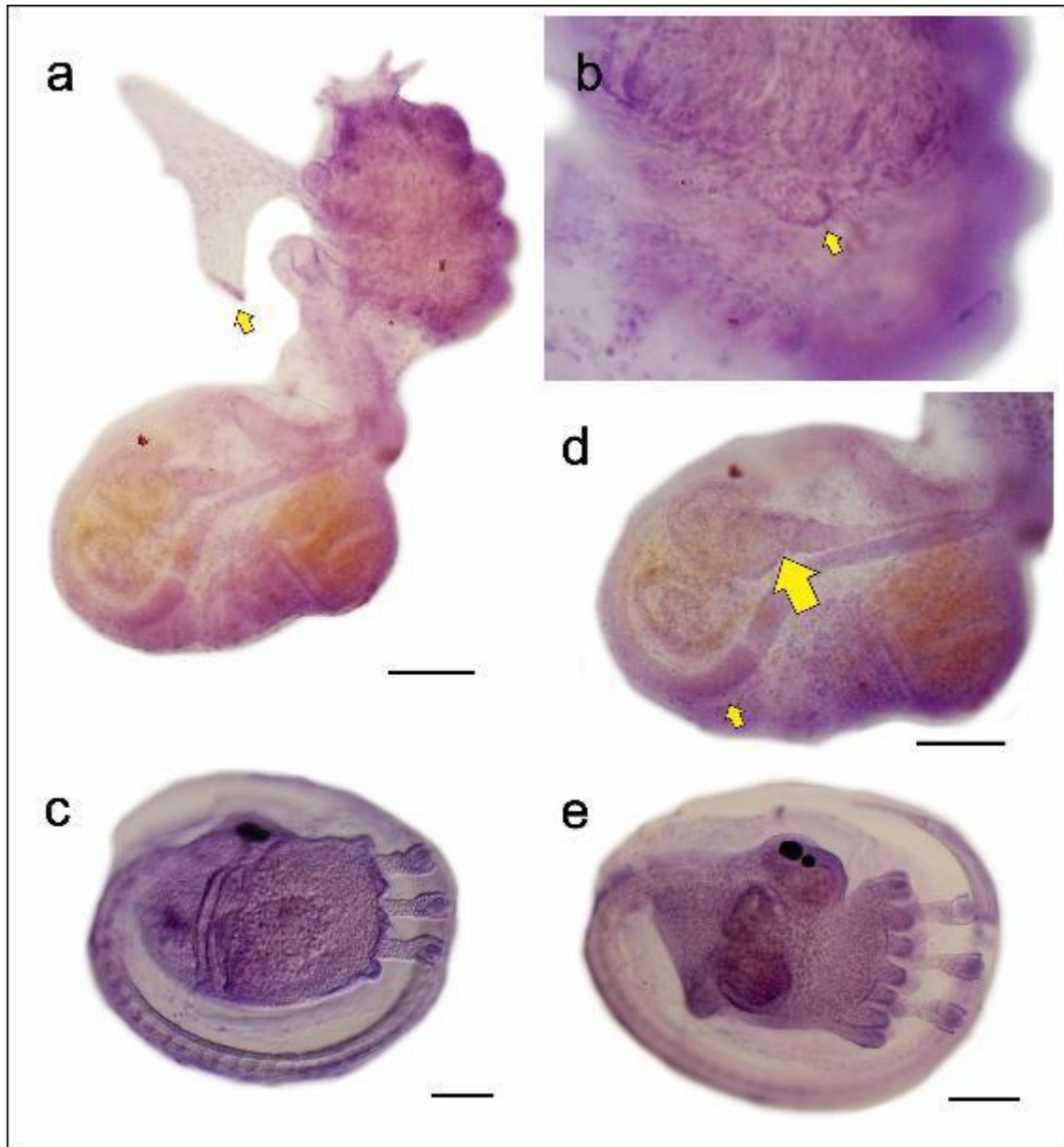


Figure 12. *Polysyncraton purou* Monniot C. & Monniot F., 1987 – slide MNHN A2-843. Zooid and larvae stained with Hemalum. a, zooid. b, lateral thoracic organ (arrow). c, not mature larva. d, gonads (large arrow indicates oocyte) and sperm duct (small arrow). e, mature larva. Scale bar: 0.1 mm.

Polysyncraton rostrum Monniot F. & Monniot C., 1997

(Figure 13)

Polysyncraton rostrum Monniot & Monniot, 1997: 11

Polysyncraton aspiculatum: Kott, 1962: 301. Monniot *et al.*, 2001b: 54, fig. 28 (in part).

Examined material. MNHN A2-1825, A2-1826 (2 slides), Pemba Island, Tanzania (05°23.07'S, 39°35.24' E and 05°27.18'S, 39°43.07' E), to 6 m.

Remarks. The characteristics of the specimens correspond with those of the original description. The zooids measure about 1.0 mm in length. The oral siphon is short, 0.1 mm long, with six large rounded lobes. The atrial aperture is wide and exposes all the pharynx. The atrial languet is usually short, thin and bifurcated. The thoracic lateral organs are circular, very small and not protruding. The muscular process was not present on the zooids. The abdomen is positioned perpendicularly to the thorax. The secondary gut loop does not overlay the stomach. The larvae are not gemmiparous, oval with 0.7 mm of trunk length. A tail with 60 µm in diameter winds about three-quarters of the way around the trunk. Three adhesive papillae close between them with peduncle short and large. The chalice of the central adhesive papillae is 70 µm in diameter and the peduncle is 162 µm long. There are eight ectodermal ampullae on each side of the larvae which range 66 to 73 µm in length. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) in the posterior region of the larval trunk. The ocellus is about 57 µm long and the distance between the ocellus and the anterior region of the tail is 183µm.

Geographical distribution. Type locality: Tanzania (Monniot and Monniot, 1997), in the SW Indian Ocean. Other localities: South Africa (Monniot *et al.* 2001), Australia (Kott 1962).

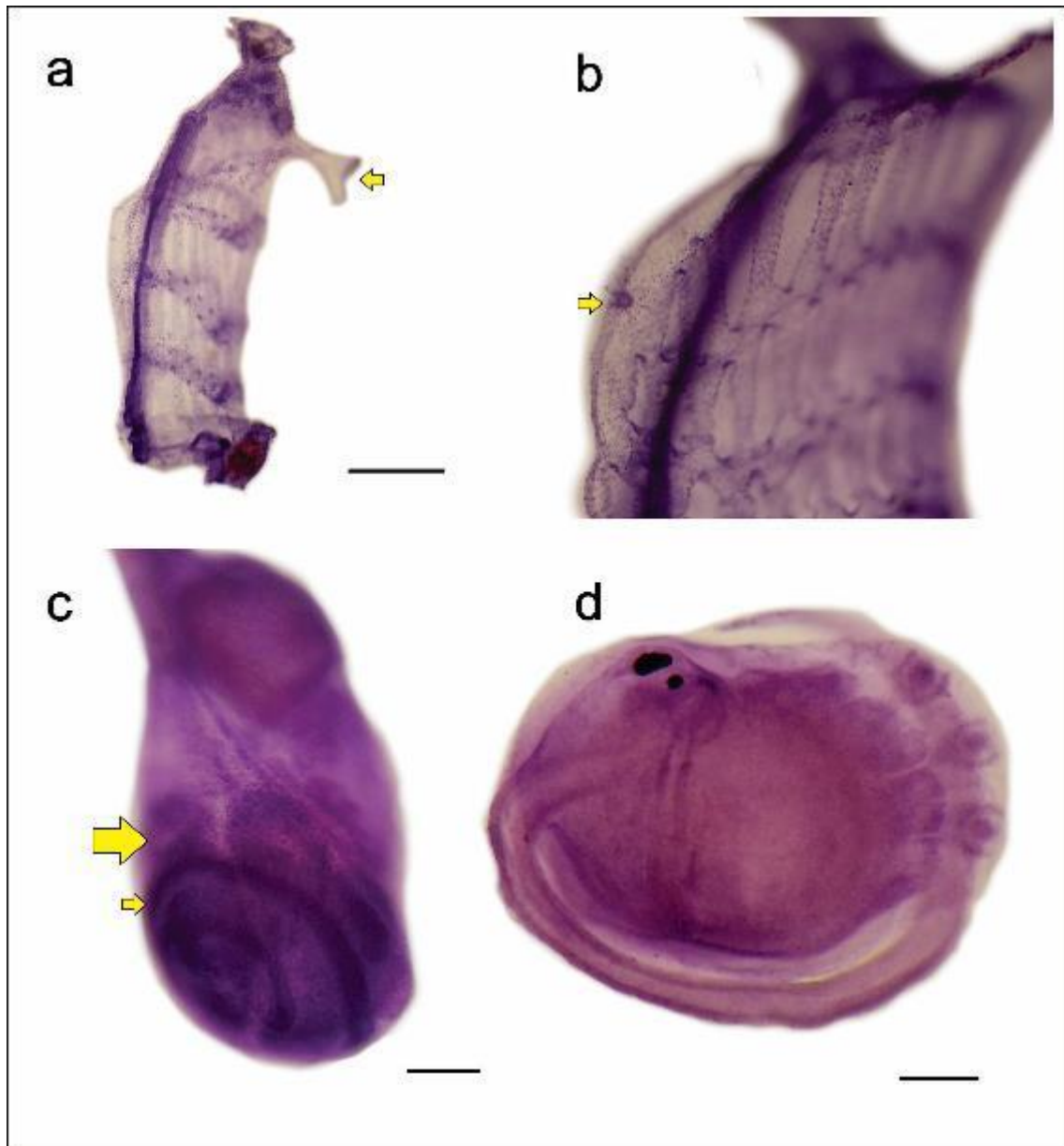


Figure 13. *Polysyncraton rostrum* Monniot F. & Monniot C., 1997 – slides MNHN A2-1825 and MNHN A2-1826. a, stained thorax (arrow indicates the atrial languet). b, stained thorax, arrow indicating the lateral thoracic organ. c, stained abdomen. Large arrow indicates the testis lobes and small arrow the coil of the sperm duct. d, stained larva. Scale bars: a = 0.2 mm, c-d = 0.1 mm.

Polysyncraton trivolutum (Millar, 1960)

(Figure 14)

Didemnum trivolutum Millar, 1960: 58, fig. 12.

Polysyncraton chondrilla: Kott, 1969: 79, fig. 97-102; 19971: 35.

Polysyncraton trivolutum: Monniot and Monniot 1983: 43 fig. 8A–H, pl. 4A–D and synonymy; Tatian *et al.* 2005: 209; Turon *et al.* 2016: 158, fig. 3C–D, G.

Examined material. AMNH 2327 one colony, West coast of South Africa (31°37.85' S, 08°20.4' E), Stat EK 11, 54 m depth, Vema Seamount Expedition, 15.11.1964. NHM 1960.10.13.202 one colony (holotype), Patagonian shelf, from 51°22' S, 68°03' W to 51°27'30" S, 67°43' W. Discovery Expedition, St W.S. 811, 99 m depth, 10.01.1932. NHM 1963.7.8.1 one colony, one slide (paratype), Falkland Islands, from 49°41' S, 59°14' W to 49°43' S, 59°15' W, Discovery Expedition, St W.S. 99, 251–225 m depth, 19.04.1927.

Remarks. The examined specimens show all the characteristics described by Millar (1960). Specimen NHM 1960.10.13.202 has been resuscitated and the material was not dissected. This species is encountered in cold waters in Antarctic and subantarctic regions (Monniot and Monniot 1983; Schories *et al.* 2015; Turon *et al.* 2016).

Geographical distribution. Southern hemisphere. Type locality: Falkland Islands (Millar, 1960). Other localities: Patagonian shelf (Millar, 1960), Antarctic (Tatian *et al.* 2005), Chile (Turon *et al.* 2016), west coast of South Africa (present study).

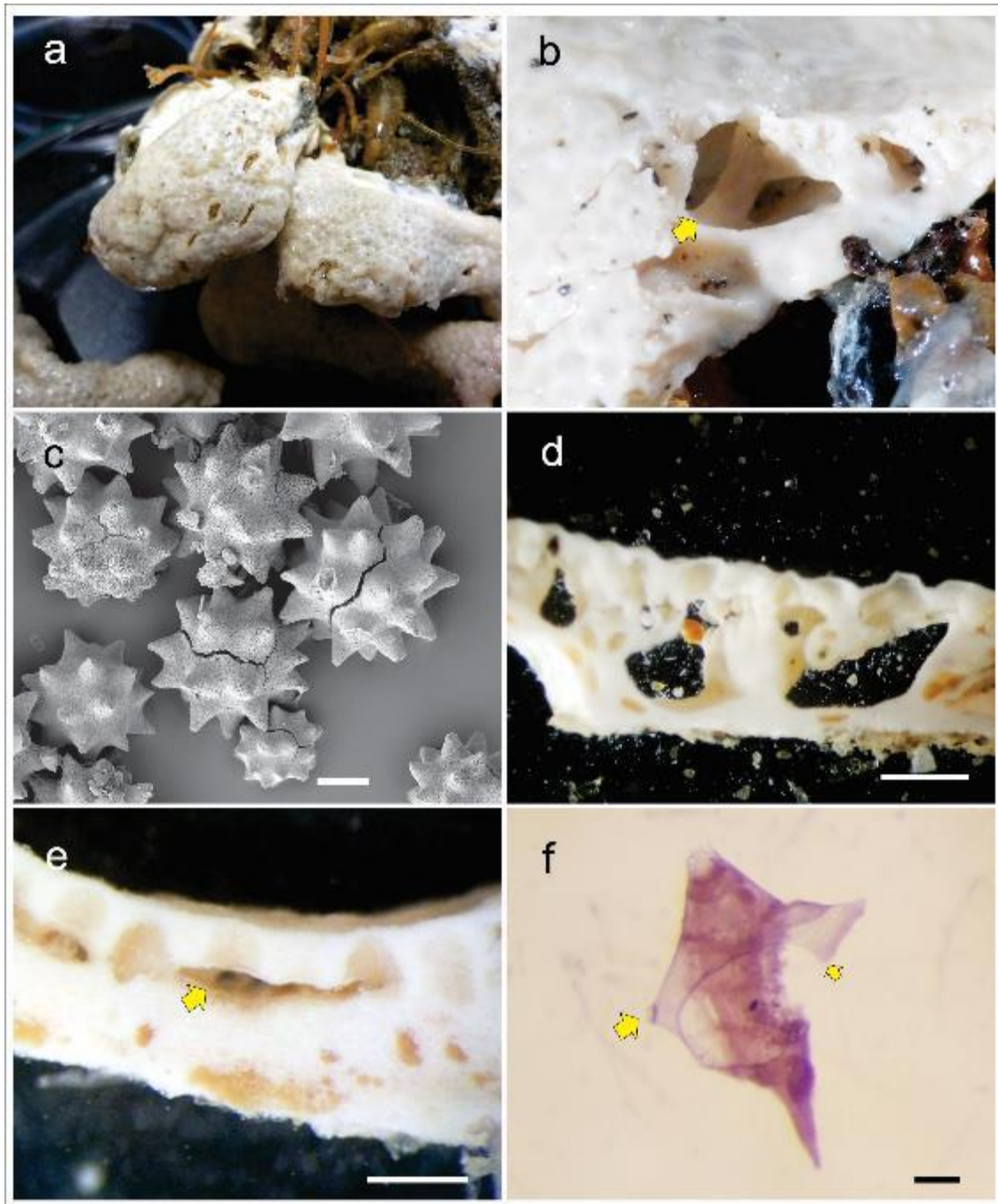


Figure 14. *Polysyncraton trivolutum* (Millar, 1960) – Type specimen NHM 1960.10.13.202. a, preserved colony, b, cross section of the colony. Arrow indicate the huge cavities present in the median region of the colony. c, spicules. d, cross section of the colony. AMNH 2327 – e, cross section of colony. Arrow indicate the thoracic cavity. f, stained thorax (big arrow indicates the lateral thoracic organ and small arrow indicates the atrial languet). Scale bars: c = 10 μ m, d-f = 0.1 mm.

Polysyncraton n. sp. 1

(Figure 15)

Holotype. ZMA (DID 08), one colony, Guiana Shelf, Suriname (07°16.8'N, 56°47.6'W), Stat. 97, 64 m depth, 13.04.1966, Snellius Onderzoek Continentaal Plat Suriname Expedition (O.C.P.S.).

Description. Colony is yellowish in preserved material, measuring about 8 cm in diameter and 2 mm in thickness. It has irregular shape, molding itself on top of a sponge. The colony surface has several common cloacal apertures with six to eight short lobes each. The cloacal cavity is wide at the thoracic level. The tunic is firm, brittle and with many papillae associated with one of the lobes of the oral siphon. The zooids form in circular systems around the cloaca plus linear systems along the cloacal channels, which are marked by a depression on the colony surface. They have a brown colour leaving white circular or irregular patches on the colony surface. Two kinds of stellate spicules are distributed in the tunic: the larger ones (40 – 60 µm in diameter) have six rays in transverse optical section, but many other shorter rays among the main ones. Also, the rays are either blunt or more pointed. The smaller spicules (23 – 50 µm in diameter, some 60 µm), have seven to eight conical rays with round tips in transverse optical section, without intermediate rays.

The zooids measure about 1.0 mm in length. The oral siphon is short with six triangular and long lobes, about 0.2 mm long. The atrial aperture is wide, exposing almost all the pharynx and an atrial languet was not observed. The pharynx has 12 stigmata in the first and second half rows, 11 on the third and nine on the posterior row. The thoracic lateral organs are circular, not protruding and localized in the anterior region of the thorax at the level of the second row of stigmata. A muscular process was not found. The oesophageal peduncle is short, positioning the abdomen vertically in relation to the thorax. The secondary gut loop does not overlay the stomach. The testis is divided in four lobes surrounded by three coils of the sperm duct.

The larvae are elliptical, with the trunk measuring 0.8 to 0.9 mm in length. Blastozooids and oozoids were not visible. A tail with a diameter of 116 µm winds half of the way around the trunk. The adhesive papillae have a short peduncle. The chalice of the central adhesive papillae is 95 µm in diameter and the peduncle is 235 µm in length. There are 12 – 14 elongated and thin ectodermal ampullae on each side of the larvae

ranging between 105 and 120 μm in length. The sensorial vesicle (including ocellus and statocyte) is slightly posterior to the mid-dorsal region of the larval trunk. The ocellus is 54 μm long and the distance between the ocellus and anterior region of the tail is 361 μm .

Remarks. The present species was collected on the Guyana Shelf off Suriname, from a location that is influenced by sediment coming from rivers (Millar 1978). Eight species of *Polysyncraton* have been reported from the Atlantic Ocean (Rocha *et al.* 2012; Paiva *et al.* 2015). *Polysyncraton* n. sp. 1 does not look like any of those species and its main characteristic consists of the large quantity of papillae on the colony surface. Furthermore, the present species has stellate spicules with short rays among the main ones, four testis lobes surrounded by three coils of the sperm duct and larvae with 12 or 14 pairs of ectodermal ampullae. *Polysyncraton marizeliae* (Paiva *et al.* 2015) has stellate spicules with conic pointed rays, larva with 27 rounded ectodermal ampullae, but the colony surface has not papillae. *Polysyncraton echinatum* Kott, 2001 (from Pacific Ocean) has colonies with papillae on the colony surface associated with the oral siphons, however the tunic is gelatinous, the spicules have conical rays but without secondary rays, larvae are a little smaller (trunk 0.6 mm long) with four subdividing ectodermal ampullae on each side. *Polysyncraton meandratum* Monniot, 1993 also four testis lobes surrounded by three coils of the sperm duct, but it has globular spicules with flat-tipped rays, atrial languet bifurcated and larva with eight pairs of ectodermal ampullae. *Polysyncraton pseudorugosum* Monniot, 1993 from New Caledonia has stellate spicules with burr-like rays and deeper common cloacal canals, but it has atrial languet, seven testis lobes and smaller larvae with 8 pairs ectodermal ampullae. *Polysyncraton reedi* has very similar zooids with oocytes in a similar position, but with a large atrial languet, testis with four lobes surrounded by two coils of the sperm duct, stellate spicules with rays divided in two, three or four teeth at their tips.

Geographical distribution. Type locality: Suriname (Guyana Shelf).

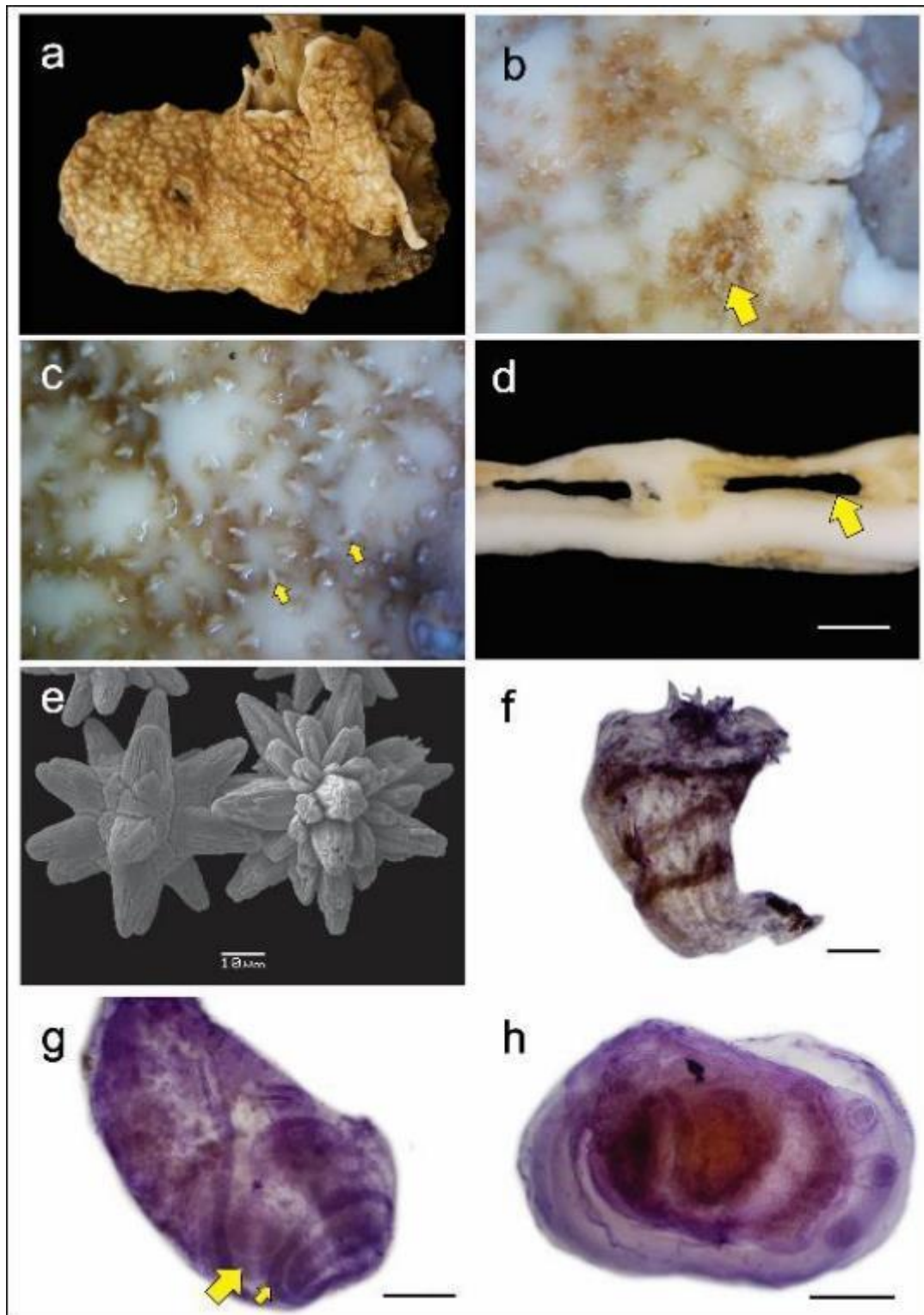


Figure 15. *Polysyncraton n. sp.1*. a, preserved colony. b, colony surface (arrow indicates the common cloacal aperture with lobes). c, papillae on the colony surface (arrows). d, cross section of the colony. Arrow indicates the cloacal cavity at the level of the thoraces. e, spicules (large type). f, thorax. g, abdomen with gonads (large arrow indicates the oocyte and small arrow the sperm duct). h, larva. Zooids and larva stained with Hemalum. Scale bars: d-f = 0.2 mm.

Polysyncraton n. sp. 2

(Figure 16)

Holotype. MZUSP (POSC-50), one colony, Brazil, Rio de Janeiro, Cabo Frio, Pargos Island, Enseada do Pinguim (22°51'10" S, 41°54'22" W), one colony, ~10 m depth, slide DID 5.02, *leg.* L.F. Skinner, SCUBA, 07.05.2014.

Paratypes. DZUP POSC-46 one colony, DZUP POSC-49 one colony. Brazil, Rio de Janeiro, Cabo Frio, Pargos Island, Enseada do Pinguim (22°51'10" S, 41°54'22" W), one colony, ~10 m depth, *leg.* L.F. Skinner, SCUBA, 07.05.2014.

Additional material. DZUP POSC-47 two colonies, DZUP POSC-48 one colony, Brazil, Rio de Janeiro, Cabo Frio, Comprida Island, Ponta Leste (22°51'41" S, 41°56'12" W), ~8 m depth, *leg.* L.F. Skinner, SCUBA, 06.05.2014.

Description. Live colonies are yellowish and measuring 3–15 cm in diameter and 2–3 mm in thickness. When preserved in formalin, colonies usually lose their color and become cream, sometimes white. They have an irregular shape, molding themselves to the substrate. The colony surface has several common cloacal apertures, each one with four short lobes or papillae, resembling a four-leaf clover. The wide cloacal cavity is thoracic. The tunic is firm, brittle and smooth. Algae were observed on the surface of some colonies. Spicules are distributed in the whole tunic, with relatively high concentrations on each side of the thorax at the level of the lateral thoracic organ. They are two kinds: stellate, 32–40 µm in diameter, with 6–7 blunt-tipped conical rays in transverse optical section; others are smaller (25 – 28 µm in diameter) with round and short rays.

Zooids are uncoloured and measure 0.8 – 1.0 mm in length. The oral siphon has six small triangular lobes, distant from each other. The atrial aperture is wide and exposing almost all the pharynx. The atrial languet is short, pointed and thin. In some specimens it was absent, probably lost during dissection. The lateral thoracic organs are elongated, not protruding and localized in the anterior region of the thorax. The pharynx has six stigmata on each half of each row. The muscular process was not found. The oesophageal peduncle is short. The gut loop has the usual shape with well-separated

components and the secondary gut loop overlaying the stomach. Only one small stoloniferous vessel projects in the abdomen. The testis is divided in three lobes surrounded by three coils of the sperm duct. The oocyte is single, measuring 0.6 mm in length.

The larvae are elliptical, gemmiparous, uncolored, the trunk measuring between 0.8 to 0.9 mm. The blastozoid is ventral to the oozoid. A tail with a diameter of 95 μm winds about one turn around the trunk. The three adhesive papillae show a short and wide peduncle. The chalice of the central adhesive papillae is 124 μm in diameter. There are ten short, rounded ectodermal ampullae on each side. The sensorial vesicle is located in the mid-dorsal region of the larval trunk. The ocellus is 45 μm long and the distance between the ocellus and the anterior region of the tail is 346 μm .

Remarks. Up to now, only two species of *Polysyncraton* were reported from Brazil, *P. amethysteum* with a distribution along the whole coastline and *P. maurizelae* Paiva *et al.*, 2015 reported from Rocas Atoll (Paiva *et al.* 2015). *Polysyncraton* n. sp. 2 differs from *P. amethysteum* by its purple color, low density of spicules concentrated in the surface of the colony and larvae with eight pairs of ectodermal ampullae. *Polysyncraton maurizelae* is orange, has a smooth common cloacal aperture, zooids with 12 stigmata in the first row, and spicules without secondary rays. In relation to other species from Atlantic, *P. louminae* (Monniot, 1983) has similar larvae but spicules with more distance between the conical rays and two testis lobes surrounded by four coils of the sperm duct. *Polysyncraton* n. sp. 2 can be distinguished from *Polysyncraton* sp. nov. 1 by the lack of papillae on the colony surface and by its gemmiparous larvae.

Geographical distribution. Type locality: Brazil (Rio de Janeiro).

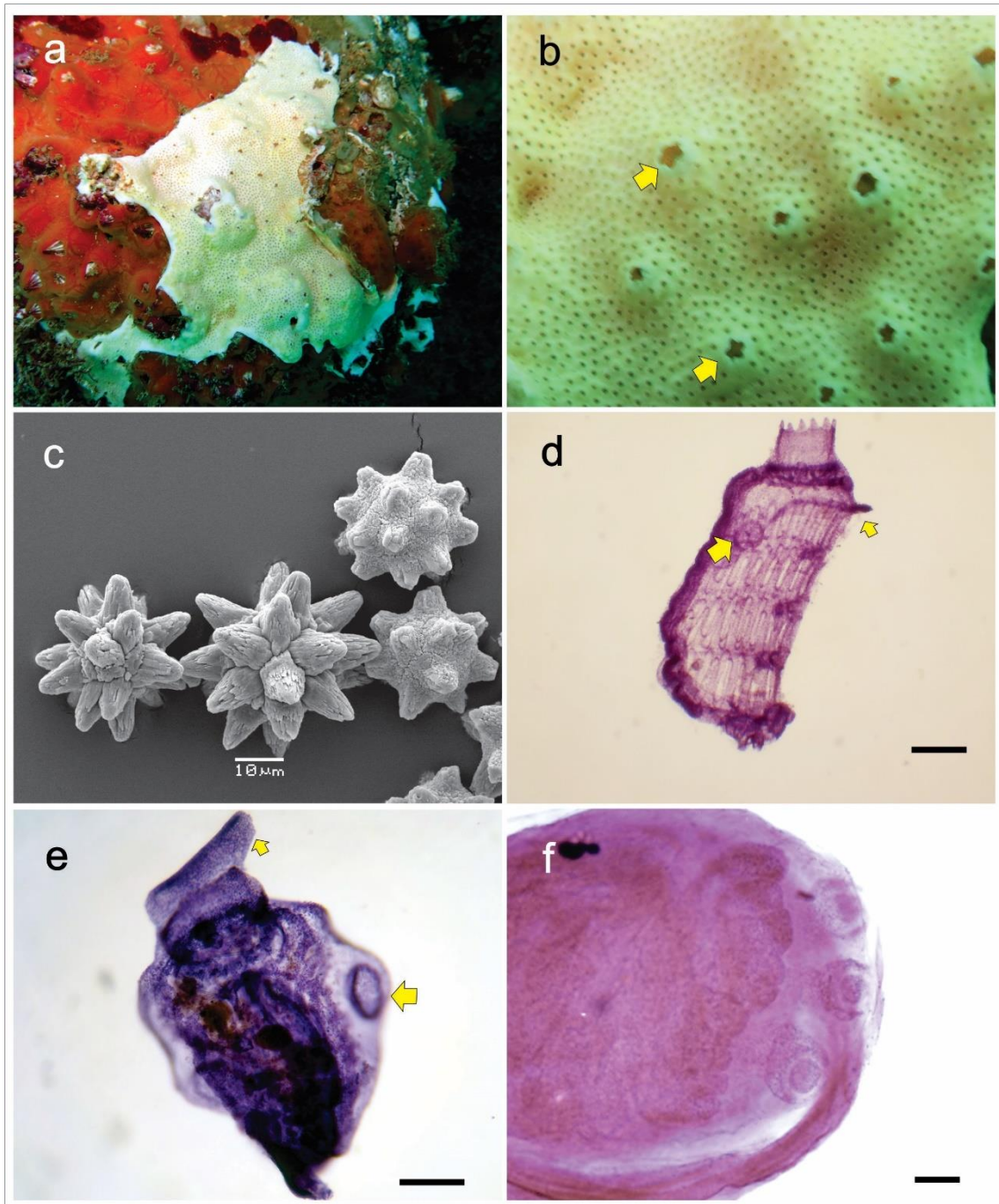


Figure 16. *Polysyncraton* n. sp. 2. a, colony *in situ*; b, colony surface (arrow indicating the common cloacal aperture with lobes); c, spicules; d-e, thorax stained (big arrow yellow indicating the lateral thoracic organ and small arrow the atrial languet); f, larva stained. Scale bars: d-f = 0.1 mm. Photo: a: L.S. Skinner.

Polysyncraton sp.

(Figure 17)

Didemnum (Polysyncraton) magnetae: Millar, 1963: 702.

Examined material. NHM 1866.3.21.20-21 two colonies, two slides, Bowerbank, Australia.

Remarks. The specimens have been previously identified as *P. magnetae* Hastings, 1931 by Millar (1963) when he analysed the specimens from Australia which were deposited at the Natural History Museum in London. The species is characterised by its gelatinous lobed colonies with common cloacal apertures with six lobes and globular spicules distributed mainly on the colony surface. Spicules have thin and numerous rays (about 8 – 10 rays in optical transverse section), measuring between 20-30 µm in diameter. The pharynx has 12 muscle bundles on each side. The atrial languet is short and bifurcated. The lateral thoracic organ is circular, not protruding, located at level of the 1^a row of stigmata, at the middle of the thorax. The testis is divided in six lobes surround by 2–3 coils of the sperm duct. Larvae are elliptical, uncolored, the trunk 1 and 1.3 mm in length. A tail winds about three-quarters of the way around the trunk. Three adhesive papillae are close together with long and thin peduncles. Eight elongated ectodermal ampullae are on each side. The sensorial vesicle is located in the central region of the larval trunk.

Polysyncraton sp. differs from *P. magnetae* by its gelatinous colony, low density of spicules in the tunic and globular spicules with 8-10 burr-like rays. *Polysyncraton magnetae* has spongy consistency, high density of spicules in the tunic, testis with 5-7 lobes, surrounded by two coils of the sperm duct; *P. meandratum* Monniot, 1993 has thin sheets colonies, a long atrial languet, 4 or 5 male follicles with 3 coils of the sperm duct and larva with 1 mm of trunk and *P. rugosum* Monniot, 1993 has flat colony, high density of spicules in the tunic, testis with seven lobes surrounded by 3 coils of the sperm duct and larva with 12 pairs of ectodermic ampullae.

Geographical distribution. Type locality: Australia (Millar 1963).

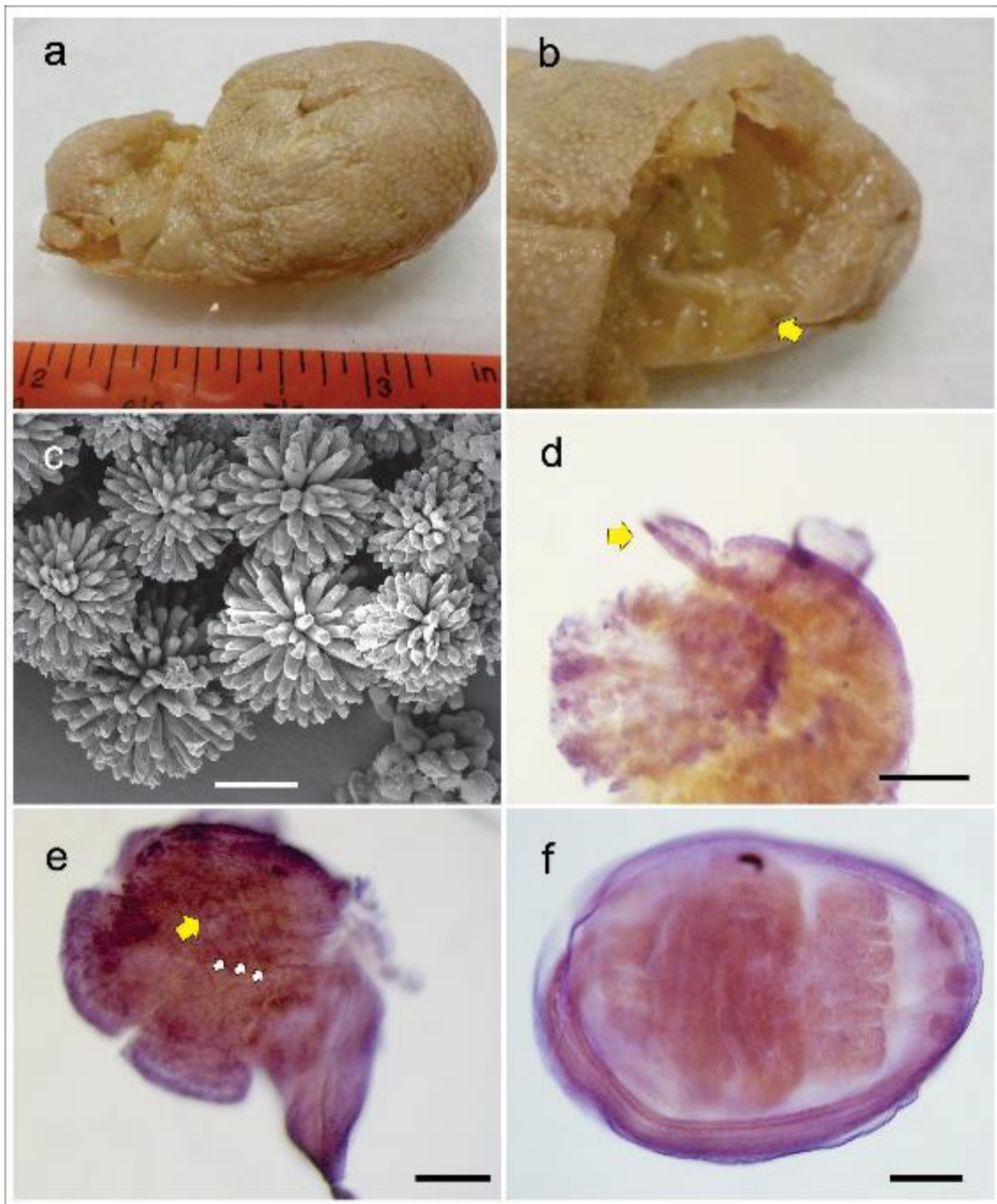


Figure 17. *Polysyncraton* sp. – Specimen from Australia NHM 1866.3.21.21. a, preserved colony, b, cross section of the colonies. Arrows indicate cavities in the middle of the colony. c, spicules. d, thorax (arrow indicating the atrial languet). e, thorax (Yellow arrow indicates the lateral thoracic organ and white arrows the muscle fibers present on each side of the thorax). f, larva. Zooids and larva stained with hemalum. Scale bars: c = 10 μ m. d-f = 0.1 mm.

Acknowledgments

We would like to thank Françoise Monniot of Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, for borrowing samples, Miranda Lowe for receiving LMO at the London Museum, Linda Cole for receiving LMO at the Smithsonian Institution National Museum of Natural History, Estefanía Rodríguez for receiving LMO at the American Museum of Natural History, Naturalis Biodiversity Center for logistical support, CNPq (141490/2014-4, 201086/2015-SWE, 445783/2014-1) financed part of this project, National Science Foundation (NSF) financed LMO visit to the American collections.

REFERENCES

- Hartmeyer R (1912) Die Acidien der Deutschen Tiefsee-Expedition. Dtsch Tiefsee-Expedition 16:225–392.
- Hastings AB (1931) Tunicata. Great Barrier Reef Expedition 1928–29. Sci Rep 4:69–109.
- Kott P (1962) The Ascidians of Australia III. Aplousobranchiata Lahille: Didemnidae Giard. Aust J Mar Freshw Res 13:265–334.
- Kott P (1975) The Ascidians of South Australia III. Northern Sector of the Great Australian Bight and additional records. Trans R Soc South Aust 99:1–20.
- Kott P (2001) The Australian Ascidiacea. Part. 4: Aplousobranchia (3), Didemnidae. Mem Queensl Museum 47:1–410.
- Kott P (2005) Ascidians from the Solomon Islands. Beagle Rec Museums Art Gall North Territ 21:53–66.
- Lafargue F (1968) Les peuplements sessiles de L'Arquipel de Glénan. II. Les Didemnidae - Systematique - Écologie. Vie Milieux 19:353–446.
- Lafargue F (1977) Révision taxonomique des Didemnidae des cotes de France (Ascidies composées) synthèse des résultats principaux. Ann l'Institut Océanographique 53:153–153.

- Lafargue F (1983) Inventaire des Ascidies Didemnidae de Roscoff (Tuniciers). *Cah Biol Mar* 24:377–381.
- Lafargue F, Tursi A (1975) Contribution a la connaissance des Didemnidae (Ascidies composées) des côtes des Pouilles (Mer Ionienne et mer Adriatique). *Vie Milieu* 25:33–48.
- Lafargue F, Wahl M (1987) The didemnid ascidian fauna of France. *Ann l’Institut Océanographique*, Paris 63:1–46.
- Lahille MF (1890) Recherches sur les Tuniciers des cotes de France. Toulouse 330p.
- Lotufo TMC, Silva AMB (2006) Biota Marinha da costa oeste do Ceará. In: Cascon HM, Lotufo TMC (eds) MMA, Probio. Fortaleza, p 248.
- Médioni A (1970) Ascidies du benthos rocheux de Banyuls-sur-Mer. Didemnidae (Ascidies composées). *Vie Milieu* 1A:25–48.
- Millar RH (1958) Some ascidians from Brazil. *Ann Mag Nat Hist* 1:497–514.
- Millar RH (1962) Further descriptions of South African ascidians. *Ann South African Museum* 46:113–196.
- Millar RH (1963) Australian ascidians in the British Museum (Natural History). *Proc Zool Soc London* 141:689–746.
- Millar RH (1977) Ascidians (Tunicata: Ascidiacea) from the Northern and North-Eastern Brazilian shelf. *J Nat Hist* 11:169–223.
- Millar RH (1978) Ascidians from the Guyana Shelf. *Netherlands J Sea Res* 12:99–106.
- Monniot C, Monniot F (1987) Les ascidies de Polynésie Française II. *Mémoires du Muséum Natl d’Histoire Nat Zool* 136:1–155.
- Monniot C, Monniot F, Laboute P (1991) Coral Reef Ascidians of New Caledonia. ORSTOM, Paris.
- Monniot C, Monniot F, Griffiths CL, Schleyer M (2001) South African Ascidians. *Ann South African Museum* 108:1–141.
- Monniot F (2016) Ascidians (Tunicata) of the French Guiana Expedition. *Zootaxa* 4114:201–245. doi: 10.11646/zootaxa.4114.3.1.
- Monniot F (1969) Sur une collection d’Ascidies composées de Dakar. *Bull du Muséum*

- Natl D'Histoire Nat 2:426–457.
- Monniot F (1993) Ascídies de Nouvelle-Calédonie XIII. Le genre *Polysyncraton*. Bull du Muséum Natl D'Histoire Nat Paris 15A:3–17.
- Monniot F, Monniot C (2001) Ascidians from the tropical western Pacific. *Zoosystema* 23:201–383.
- Monniot F, Monniot C (2008) Compléments sur la diversité des ascidies (Ascidacea, Tunicata) de l'ouest Pacifique tropical. *Zoosystema* 30:799–872.
- Moure JS, Björnberg TKS, Loureiro TS (1954) Protochordata ocorrentes na entrada da Baía de Paranaguá. *Dusenía* 5:233–242.
- Nott JT (1892) On the Composite Ascidians of the North Shore Reef. *Trans New Zel Inst* 24:303–395.
- Oliveira FAS, Michonneau F, Lotufo TMC (2017) Molecular phylogeny of Didemnidae (Ascidacea:Tunicata). *Zool J Linn Soc* XX:1–10.
- Paiva S V., Oliveira Filho RR De, Lotufo TMDC (2015) Ascidians from Rocas Atoll, northeast Brazil. *Front Mar Sci* 2:1–20. doi: 10.3389/fmars.2015.00039.
- Pérès JM (1956) Études sur le Seuil Siculo-Tunisien. II. Ascídies (Résult. Scient. Campagne de la “Calipso”, VII). *Ann l'Institut Océanographique*, Paris 82:265–304.
- Pérès JM (1957) Ascídea récoltées dans les Parages des Baléares par le Professeur Lacaze-Duthiers. *Vie Milieux*.
- Pérès JM (1958) Origine et affinités du peuplement en Ascídies de la Méditerranée. *Rapp P V CIESM* 14:493–502.
- Pérès JM (1959) Campagne de la Calypso en mer d'Alboran et dans la baie Ibéro-Marocaine (1958). I. Ascídies. *Ann l'Institut Océanographique*, Paris 4:295–313.
- Rocha RM, Moreno TR, Metri R (2005) Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Zool* 22:461–476.
- Rocha RM, Zanata TB, Moreno TR (2012) Keys for the identification of families and genera of Atlantic shallow water ascidians. *Biota Neotrop* 12:269–303. doi: 10.1590/S1676-06032012000100022.
- Rodrigues SA (1962) Algumas ascídias do litoral sul do Brasil. *Bol Fac Fil Ciên Letr Univ S Paulo* 24:193–216.

- Sluiter CP (1909) Die Tunicaten der Siboga Expedition. Pt II. Die merosomen Ascidien. Siboga-Expeditie 56B:1–112.
- Turon X (1986) Morfología de las espículas en las especies de la familia Didemnidae (Ascidiacea) del litoral de Cataluña e Islas Baleares. Misc Zoológica 10:213–222.
- Van Name WG (1902) The Ascidians of the Bermuda Islands. Trans Connecticut Acad Arts Sci 11:325–412.
- Van Name WG (1921) Ascidians of the west indian region and south eastern United States. Bull Am Museum Nat Hist 44:283–494.
- Van Name WG (1945) The North and South American ascidians. Bull Am Museum Nat Hist 84:1–476.

CONCLUSÕES GERAIS

O conhecimento sobre a diversidade existente dentro de Didemnidae ainda é limitado, pois, a medida que uma nova região é estudada, novas espécies são encontradas. Como resultado disso, 10 espécies desconhecidas são descritas aqui. A fauna de didemnideos é conhecida principalmente na região Indo-Pacífica, portanto, ainda há muito o que ser explorado não só lado oeste e leste do continente americano, mas também no Atlântico Leste.

Grande parte do material analisado neste trabalho foi proveniente de coleções depositadas em vários museus. Tratam-se, portanto, de espécies já descritas com algumas descrições complementadas no decorrer deste estudo. Uma das maiores dificuldades foi encontrar amostras com características morfológicas diagnósticas para identificar as espécies. Muitas delas foram coletadas fora de seu período reprodutivo e, portanto, larvas e/ou gônadas não estavam presentes nas amostras. Devido à dificuldade na própria identificação taxonômica dos espécimes em Didemnidae e também na diversidade existente no grupo, muitas amostras coletadas em diversas expedições encontram-se apenas depositadas nos museus. Dessa forma, muitos deles contém amostras para analisar sem a necessidade de novas coletas.

Mesmo utilizando um único marcador molecular (COX1), complexos de espécies crípticas puderam ser revelados, esclarecendo problemas taxonômicos relacionados à falta de estruturas desenvolvidas no material coletado que pudessem fornecer caracteres morfológicos diagnósticos das espécies ou à sobreposição de características entre elas. Uma vez que as espécies estão bem delimitadas, podem ser utilizadas como modelos em estudos de fisiologia, evolução do desenvolvimento, bioinvasão, entre outros.

Outras fontes de evidências como biogeografia e outros marcadores moleculares devem ser utilizados para que possamos incrementar o nosso conhecimento taxonômico acerca deste grupo. A melhor delimitação de espécies irá também beneficiar outros campos de conhecimento, pois especificamente os gêneros *Didemnum* e *Polysyncraton*, são modelos que oferecem várias oportunidades de pesquisas nos campos da biologia evolutiva e do desenvolvimento, bem como em bioinvasão marinha.

REFERÊNCIAS

- ALBERTE, R.S., CHENG, L. & LEWIN, R.A. *Photosynthetic characteristics of Prochloron sp./ascidian symbioses*. Marine Biology 90, 575–587, 1986.
- ARRIBAS, P., ANDÚJAR, C., SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, D., ABELLÁN, P. & MILLÁN, A. *Integrative taxonomy and conservation of cryptic beetles in the Mediterranean region (Hydrophilidae)*. Zoologica Scripta 42, 182–200, 2013.
- BARROS, R.C., ROCHA, R.M. & PIE, M.R. *Human-mediated global dispersion of Styela plicata (Tunicata, Ascidiacea)*. Aquatic Invasions 4, 45–57, 2009.
- BERRILL, N.J. *Ascidians of the Bermudas*. Biological Bulletin of Marine Biology Laboratory (Woods Hole) 62, 77–88, 1932.
- CARLISLE, D.B. *Notes on the Didemnidae (Ascidiacea). III. A comparison of Didemnum maculosum, D. candidum, D. helgolandicum, and Trididemnum allenii*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 33, 313–324, 1954.
- CRUZ-BARRAZA, J.A., CARBALLO, J.L., ROCHA-OLIVARES, A., EHRLICH, H. & HOG, M. *Integrative taxonomy and molecular phylogeny of genus Aplysina (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific*. PLoS ONE 7, 2012.
- DIAS, G.M., ROCHA, R.M., LOTUFO, T.M.C. & KREMER, L.P. *Fifty years of ascidian biodiversity research in São Sebastião, Brazil*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 93, 273–282, 2013.
- GAMA, P.B., LEONEL, R.M.V., HERNÁNDEZ, M.I.M. & MOTHES, B. *Recruitment and colonization of colonial ascidians (Tunicata: Ascidiacea) on intertidal rocks in Northeastern Brazil*. Iheringia 96, 165–172, 2006.
- GOODBODY, I. *Ascidians from Caribbean shallow water localities*. Studies on the fauna of Curaçao and other caribbean islands 203, 62–76., 1984a.
- GOODBODY, I. *The ascidian fauna of two contrasting lagoons in the Netherlands Antilles: Piscadera Baai, Curaçao, and the Lac of Bonaire*. Studies on the fauna of Curaçao and other caribbean islands 67, 21–61, 1984b.
- GOODBODY, I. *Diversity and distribution of ascidians (Tunicata) in the Pelican Cays, Belize*. Atoll Research Bulletin 480, 303–333, 2000.

- GOODBODY, I. *The Ascidian Fauna of Port Royal, Jamaica. I. Harbor and Mangrove dwelling species*. Bulletin of Marine Science 73, 457–476, 2003.
- GUTIÉRREZ-VALENCIA, J., GUTIÉRREZ, Y. & G. DIAS, L. *Species delimitation in the crypsis-defended and polymorphic stick insects of the genus Libethra (Phasmatodea, Diapheromeridae)*. Zoologica Scripta 46, 693–705, 2017.
- HALL, T.A. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95–98, 1999.
- HARTMEYER, R. *Die Acidien der Deutschen Tiefsee-Expedition*. Deutschen Tiefsee-Expedition 16, 225–392, 1912.
- HARTMEYER, R. *Die Ascidienfauna des Trondhjemsfjords*. Norske Selskab Skrifter, 1–48, 1922.
- HASTINGS, A.B. *Tunicata*. Great Barrier Reef Expedition 1928–29. Scientific Reports 4, 69–109, 1931.
- HEETHOFF, M., LAUMANN, M., WEIGMANN, G. & RASPOTNIG, G. *Integrative taxonomy: Combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic Trhypochthonius tectorum complex (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae)*. Frontiers in zoology 8, 2, 2011.
- HERDMAN, W.A. *Report on the Tunicata collected during the voyage of H.M.S. "Challenger" during the years 1873-1876. Part. II. Ascidiae compositae*. Rep. Voy. Challenger 14, 1–399, 1886.
- HESS, J.E., SWALLA, B.J. & MORAN, P. *New molecular markers to genetically differentiate populations of Didemnum vexillum (Kott, 2002) - an invasive ascidian species*. Aquatic Invasions 4, 299–310, 2009.
- HIROSE, M. & HIROSE, E. *DNA barcoding in photosymbiotic species of Diplosoma (Ascidacea: Didemnidae), with the description of a new species from the southern Ryukyus, Japan*. Zoological Science 26, 564–568, 2009.
- HIROSE, M., NOZAWA, Y. & HIROSE, E. *Genetic isolation among morphotypes in the photosymbiotic didemnid Didemnum molle (Ascidacea, Tunicata) from the Ryukyus and Taiwan*. Zoological science 27, 959–964, 2010.
- HIROSE, M., YOKOBORI, S. & HIROSE, E. *Potential speciation of morphotypes in the*

- photosymbiotic ascidian* *Didemnum molle* in the Ryukyu Archipelago, Japan. Coral Reefs 28, 119–126, 2009.
- KATOH, K. & STANDLEY, D.M. MAFFT: Iterative refinement and additional methods. Methods in Molecular Biology 1079, 131–146, 2014.
- KOTT, P. *The ascidians of Australia. III. Aplousobranchiata Lahille: Didemnidae Giard.* Australian Journal of Marine and Freshwater Research 13, 265–334, 1962.
- KOTT, P. *Antarctic Ascidiacea.* Antarctic Research Series 13, 1–239, 1969.
- KOTT, P. *The Ascidians of South Australia III. Northern Sector of the Great Australian Bight and additional records.* Transactions of the Royal Society of South Australia 99, 1–20, 1975.
- KOTT, P. *The Ascidians of the Reef Flats of Fiji.* Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 147–212, 1981.
- KOTT, P. *The Australian Ascidiacea. Part. 4: Aplousobranchia (3), Didemnidae.* Memoirs of the Queensland Museum 47, 1–410, 2001.
- KOTT, P. *A complex didemnid ascidian from Whangamata, New Zealand.* Journal of the Marine Biological Association of the UK 82, 625–628, 2002a.
- KOTT, P. *Ascidiacea (Tunicata) from Darwin, Northern Territory, Australia.* The Beagle, Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory 18, 19–55, 2002b.
- KOTT, P. *New syntheses and new species in the Australian Ascidiacea.* Journal of Natural History 37, 1611–1653, 2003.
- KOTT, P. *New and little-known species of Didemnidae (Ascidiacea, Tunicata) from Australia (part 1).* Journal of Natural History 38, 731–774, 2004.
- KOTT, P. *New and little-known species of Didemnidae (Ascidiacea, Tunicata) from Australia (part 3).* Journal of Natural History 39, 2409–2479, 2005.
- Kott, P. *New and little-known species of Didemnidae (Ascidiacea, Tunicata) from Australia (part 4).* Journal of Natural History 41, 1163–1211, 2007.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets.* Molecular biology and evolution 33, 1870–187, 2016.

- LAFARGUE, F. *Les peuplements sessiles de L'Arquipel de Glénan. II. Les Didemnidae - Systematique - Écologie*. Vie Milieu 19, 353–446, 1968.
- LAFARGUE, F. *Description d'un néotype de Didemnum candidum Savigny, 1816 espece-type de mer rouge (ascidie composée)*. Vie Milieu 24, 341–356, 1974.
- LAFARGUE, F. *Révision taxonomique des Didemnidae des Côtes de France (Ascidies composées). Les espèces de Banyuls-sur-Mer. Genre Didemnum. Première partie: Larves a trois ventouses*. Annales de l'Institut Océanographique, Paris 51, 173–194, 1975.
- LAFARGUE, F. *Révision Taxonomique des Didemnidae des côtes de France (Ascidies composées). Les espèces de Banyuls-sur-mer. Genre Didemnum. Deuxième partie: larves a deux ventouses*. Annales de l'Institut Océanographique, Paris 52, 259–281, 1976.
- LAFARGUE, F. *Révision taxonomique des Didemnidade des cotes de France (Ascidies composées) synthèse des résultats principaux*. Annales de l'Institut Océanographique 53, 153–153, 1977.
- LAFARGUE, F. *Inventaire des Ascidies Didemnidae de Roscoff (Tuniciers)*. Cahiers de Biologie Marine 24, 377–381, 1983.
- LAFARGUE, F. & WAHL, M. *Contribution to the knowledge of littoral ascidians (Ascidacea, Tunicata) of the Senegalese coast*. Bulletin de l'Institut français d'Afrique noire 46A, 385–402, 1986.
- LAFARGUE, F. & WAHL, M. *The didemnid ascidian fauna of France*. Annales de l'Institut Océanographique, Paris 63, 1–46, 1987.
- LAFARGUE, F., RAMOS, A.A., TURON, X., BANAIGS, B. & WAHL, M. *The littoral ascidians of the Spanish Mediterranean. I. From Port Bou to the Islas Medas*. Vie Milieu 36, 133–139, 1986.
- LAMBERT, G., FAULKES, Z., LAMBERT, C.C. & SCOFIELD, V.L. *Ascidians of south Padre Island, Texas, with a key to species*. Texas Journal of Science 57, 251–262, 2005.
- LOPES, E.M., PÉREZ-PORTELA, R., PAIVA, P.C. & VENTURA, C.R.R. *The molecular phylogeny of the sea star Echinaster (Asteroidea: Echinasteridae) provides insights for genus taxonomy*. Invertebrate Biology 135, 235–244, 2016.

- LÓPEZ-LEGENTIL, S., SONG, B., BOSCH, M., PAWLIK, J.R. & TURON, X. *Cyanobacterial diversity and a new Acaryochloris-like symbiont from bahamian sea-squirrels*. PLoS ONE 6, 2011.
- LOTUFO, T.M.C. *Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro*. 183 p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2002.
- LOTUFO, T.M.C. & DIAS, G.M. *Didemnum galacteum, a new species of white didemnid (Chordata: Ascidiacea: Didemnidae) from Brazil*. Proceedings of the Biological Society of Washington 120, 137–142, 2007.
- LOTUFO, T.M. DA C. & SILVA, A.M.B. *Ascidiacea*. In: H. Matthews-Cascon and T. M. da C. Lotufo (Eds), *Biota Marinha da Costa Oeste do Ceará*. Ministério do Meio Ambiente, Fortaleza, pp. 221–247, 2006.
- MARKS, J.A. *Three sibling species of didemnid ascidians from northern Norway: Didemnum albidum (Verrill, 1871), Didemnum polare (Hartmeyer, 1903), and Didemnum romssae sp.nov.* Canadian Journal of Zoology 74, 357–379, 1996.
- MÉDIONI, A. *Ascidies du benthos rocheux de Banyuls-sur-Mer. Didemnidae (Ascidies composées)*. Vie Milieu 1A, 25–48, 1970.
- MICHAELSEN, W. *Die Krikobranchien Ascidien des westlichen Indischen Ozeans: Didemniden*. Jahrbuch der Hamburgischen wissenschaftlichen Anstalten 37, 1–76, 1920.
- MICHAELSEN, W. *Neue und altbekannte Ascidien aus dem Reichsmuseum zu Stockholm*. Mitteilungen aus dem Zoologischen Staatsinstitut und Zoologischen Museum Hamburg 40, 1–60, 1923.
- MICHAELSEN, W. *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk naturhistorisk Forening i Kjøbenhavn*, 1913–1966, 1924.
- MILLAR, R.H. *On a collection of ascidians from the Gold Coast*. Proceedings of the Zoological Society of London 123, 277–325, 1953.
- Millar, R.H. *Some ascidians from Brazil*. Annals and Magazine of Natural History 1, 497–514, 1958.
- Millar, R.H. *Further descriptions of South African ascidians*. Annals of the South African Museum 46, 113–221, 1962.

- MILLAR, R.H. *Some ascidians from the Caribbean*. Studies on the fauna of Curaçao and other caribbean islands 13, 61–77, 1962.
- MILLAR, R.H. *Australian ascidians in the British Museum (Natural History)*. Proceedings of the Zoological Society London 141, 689–746, 1963.
- MILLAR, R.H. *Ascidians (Tunicata: Ascidiacea) from the Northern and North-Eastern Brazilian shelf*. Journal of Natural History 11, 169–223, 1977.
- MILLAR, R.H. *Ascidians from the Guyana Shelf*. Netherlands Journal of Sea Research 12, 99–106, 1978.
- MILLAR, R.H. *Ascidians collected during the South-east Pacific Biological Oceanographic Program (SEPBOP)*. Journal of Natural History 22, 225–240, 1988a.
- MILLAR, R.H. *The occurrence of the ascidian Didemnum albidum (Verrill, 1871) on the West Coast of Scotland*. Sarsia 73, 147–148, 1988b.
- MILLER, M.A., PFEIFFER, W. & SCHWARTZ, T. *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees*. In: 2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010, 2010.
- MILNE EDWARDS, H. *Observation sur les Ascidies composees des cotes de la Manche*. Memories de l'Academie (royale) des Sciencies de l'Institute (imperial) de France 18, 217–326, 1841.
- MONNIOT, C. *Ascidies phlébobranches du canal du Mozambique*. Zoosystema 19, 557–571, 1997.
- MONNIOT, C. & MONNIOT, F. *Les ascidies de Polynésie Française*. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. Zoologie 136, 1–155, 1987.
- MONNIOT, C. & MONNIOT, F. *Additions to the inventory of Eastern Tropical Atlantic ascidians; arrival of cosmopolitan species*. Bulletin of Marine Science 54, 71–93, 1994.
- MONNIOT, C. & MONNIOT, F. *Records of ascidians from Bahrain, Arabian Gulf with three new species*. Journal of Natural History 31, 1623–1643, 1997a.
- MONNIOT, C. & MONNIOT, F. *South African Ascidians*. Annals of the South African Museum, 2001a.

- Monniot, C., Monniot, F. & Laboute, P. (1991) *Coral Reef Ascidiarians of New Caledonia*. ORSTOM, Paris.
- MONNIOT, C., MONNIOT, F., GRIFFITHS, C.L. & SCHLEYER, M. *South African Ascidiarians*. Annals of the South African Museum 108, 1–141, 2001.
- MONNIOT, F. *Sur une collection d'Ascidiées composées de Dakar*. Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle 2, 426–457, 1969.
- MONNIOT, F. *Ascidiées littorales et bathyales récoltées au cours de la campagne Biaçores: Aplousobranches*. Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle 251, 1287–1326, 1974.
- MONNIOT, F. *Ascidiées littorales de Guadeloupe I. Didemnidae*. Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris 5A, 5–49, 1983.
- MONNIOT, F. *Ascidiées littorales de Guadeloupe VIII. Questions de systématique évolutive posées par les Didemnidae*. Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris 6A, 885–905, 1984.
- MONNIOT, F. *Ascidiées de Nouvelle-Calédonie XIII. Le genre Polysyncraton*. Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris 15A, 3–17, 1993.
- MONNIOT, F. *Ascidiées de Nouvelle-Calédonie XV. Le genre Didemnum*. Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris 16A, 299–344, 1995.
- MONNIOT, F. *Some comments on the Ascidiarians of New Caledonia*. In: C. E. Payri and B. Richer de Forges (Eds), *Compendium of marine species of New Caledonia*. IRD Nouméa, pp. 349–356, 2007.
- MONNIOT, F. *Some new data on tropical western Pacific Ascidiarians*. Zootaxa 2561, 1–29, 2010.
- MONNIOT, F. *Ascidiarians (Tunicata) of the French Guiana Expedition*. Zootaxa 4114, 201–245, 2016.
- MONNIOT, F. & MONNIOT, C. *New Collections of Ascidiarians from the Western Pacific and Southeastern Asia III*. Micronesica 29, 167–183, 1996.
- MONNIOT, F. & MONNIOT, C. *Ascidiarians collected in Tanzania*. Journal of East African Natural History 86, 1–35, 1997b.
- MONNIOT, F. & MONNIOT, C. *Ascidiarians from the tropical western Pacific*.

- Zoosystema 23, 201–383, 2001b.
- MONNIOT, F. & MONNIOT, C. *Compléments sur la diversité des ascidies (Ascidacea, Tunicata) de l'ouest Pacifique tropical*. Zoosystema 30, 799–872, 2008.
- NOTT, J.T. *On the Composite Ascidians of the North Shore Reef*. Transactions New Zealand Institute 24, 303–395, 1892.
- OKA, A.T., SUETSUGU, M. & HIROSE, E. *Two new species of Diplosoma (Ascidacea: Didemnidae) bearing prokaryotic algae prochloron from Okinawajima (Ryukyu Archipelago, Japan)*. Zoological science 22, 367–74, 2005.
- OLIVEIRA-FILHO, R.R. *Caracterização das ascídias em regiões portuárias do Ceará*. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.
- OLIVEIRA, F.A.S., MICHONNEAU, F. & LOTUFO, T.M.C. *Molecular phylogeny of Didemnidae (Ascidacea:Tunicata)*. Zoological Journal of the Linnean Society XX, 1–10, 2017.
- PADULA, V., ARAUJO, A. K., MATTHEWS-CASCON, H. & SCHRODL, M. *Is the Mediterranean Nudibranch Cratena peregrina (Gmelin, 1791) present on the Brazilian Coast? Integrative species delimitation and description of Cratena minor n. sp.* Journal of Molluscan Studies, 1–10, 2014.
- PAIVA, S. V., OLIVEIRA FILHO, R.R. & LOTUFO, T.M.C. *Ascidians from Rocas Atoll, northeast Brazil*. Frontiers in Marine Science 2, 1–20, 2015.
- PENN, O., PRIVMAN, E., LANDAN, G., GRAUR, D. & PUPKO, T. *An alignment confidence score capturing robustness to guide tree uncertainty*. Molecular biology and evolution 27, 1759–67, 2010.
- PÉRÈS, J.M. *Contribution à l'étude des Ascidies de la côte occidentale d'Afrique*. Bulletin de l'Institut français d'Afrique noire 11, 159–207, 1949.
- PÉRÈS, J.M. *Études sur le Seuil Siculo-Tunisien. II. Ascidies (Résult. Scient. Campagne de la "Calipso", VII)*. Annales de l'Institut Océanographique, Paris 82, 265–304, 1956.
- PÉRÈS, J.M. *Origine et affinités du peuplement en Ascidies de la Méditerranée*. Rapp. P. V. CIESM 14, 493–502, 1958.

- PÉRÈS, J.M. *I. Ascidies*. Campagne de la Calypso en mer d'Alboran et dans la baie Ibéro-Marocaine (1958), 1959.
- PÉRÈS, J.M. *Sur une collection d'ascidies de la côte israélienne de la Mer Rouge et de la péninsule du Sinai*. Bulletin of Sea Fisheries Research Station, Haifa 30, 39–47, 1962.
- PÉREZ-PORTELA, R., ARRANZ, V., RIUS, M. & TURON, X. *Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities*. Scientific reports 3, 1–10, 2013.
- PÉREZ-PORTELA, R. & TURON, X. *Phylogenetic relationships of the Clavelinidae and Pycnoclavellidae (Ascidacea) inferred from mtDNA data*. Invertebrate Biology 127, 108–120, 2008.
- PRIMO, C. & VÁZQUEZ, E. *Antarctic ascidians: an isolated and homogeneous fauna*. Polar Research 28, 403–414, 2009.
- PUILLANDRE, N., LAMBERT, A., BROUILLET, S. & ACHAZ, G. *ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation*. Molecular Ecology 21, 1864–1877, 2012.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. *A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System*. PLoS ONE 8, 2013.
- RAZKIN, O., GÓMEZ-MOLINER, B.J., VARDINOYANNIS, K., MARTÍNEZ-ORTÍ, A. & MADEIRA, M.J. *Species delimitation for cryptic species complexes: case study of Pyramidula (Gastropoda, Pulmonata)*. Zoologica Scripta 46, 55–72, 2017.
- ROCHA, R.M. & BONNET, N.Y.K. *Ascídias (Tunicata, Ascidacea) introduzidas no Arquipélago de Alcatrazes, São Paulo*. Iheringia 99, 27–35, 2009.
- ROCHA, R.M. & MONNIOT, F. *Didemnum rodriguesi sp. nov., a new didemnid tunicate common to southern Brazil and New Caledonia*. Annales de l'Institut Océanographique 69, 261–265, 1993.
- ROCHA, R.M. & MONNIOT, F. *Taxonomic and ecological notes on some Didemnum species (ascidiacea, didemnidae) from São Sebastião Channel, South-Eastern Brazil*. Revista Brasileira de Biologia 55, 639–649, 1995.
- ROCHA, R.M., DIAS, G.M. & LOTUFO, T.M.C. *Checklist das ascídias (Tunicata,*

- Ascidiacea*) do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 11, 749–759, 2011.
- ROCHA, R.M., MORENO, T.R. & METRI, R. *Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil*. *Revista Brasileira de Zoologia* 22, 461–476, 2005.
- ROCHA, R.M., NEVES, I.M. & GAMBA, G.A. *New species of Didemnidae (Tunicata: Ascidiacea) from the tropical coast of Brazil*. *Zootaxa* 3905, 381–396, 2015.
- ROCHA, R.M., ZANATA, T.B. & MORENO, T.R. *Keys for the identification of families and genera of Atlantic shallow water ascidians*. *Biota Neotropica* 12, 269–303, 2012.
- ROCHA, R.M., GUERRA-CASTRO, E., LIRA, C., PAULS, S.M., HERNÁNDEZ, I., PÉREZ, A., SARDI, A., PÉREZ, J., HERRERA, C., CARBONINI, A.K., CARABALLO, V., SALAZAR, D., DIAZ, M.C. & CRUZ-MOTTA, J.J. *Inventory of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the National Park La Restinga, Isla Margarita, Venezuela*. *Biota Neotropica* 10, 1–10, 2010.
- RODRIGUES, S.A. *Algumas ascídias do litoral sul do Brasil*. *Fac. Fil. Ciên. Letr. Uni. S. Paulo* 24, 193–216, 1962.
- RODRIGUES, S.A., ROCHA, R.M. & LOTUFO, T.M.C. *Guia ilustrado para Identificação das Ascídias do Estado de São Paulo*. FAPESP, 1998.
- RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D.L., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M.A. & HUELSENBECK, J.P. *MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space*. *Systematic Biology* 61, 539–542, 2012.
- SAVIGNY, J.C. *Recherches anatomiques sur les ascidies composées et sur les ascidies simples—Système de la classe des Ascidies*. *Memoires sur les animaux sans vertebres* 2, 1–239, 1816.
- SHENKAR, N. *Ascidian (Chordata, Ascidiacea) diversity in the Red Sea*. *Marine Biodiversity* 42, 459–469, 2012.
- SLUITER, C.P. *Beiträge zur Kenntniss der Fauna von Süd-Afrika II. Tunicaten*. *Zoologische Jahrbucher. Syst.* 11, 1–64, 1898a.
- SLUITER, C.P. *Tuniciers recueillis en 1896 par la CHAZALIE dans la Mer des Antilles*.

- Memoires de la Société Zoologique de France 11, 5–34, 1898b.
- SLUITER, C.P. *Die Tunicaten der Siboga Expedition. Pt II. Die merosomen Ascidien.* Siboga-Expeditie 56B, 1–112, 1909.
- SPOEL, S. VAN DER. *Catalogue of the type specimens of Tunicata in the Zoological Museum in Amsterdam.* Bulletin Zoologisch Museum, Universiteit van Amsterdam 1, 157–200, 1968.
- STACH, T. & TURBEVILLE, J.M. *Phylogeny of Tunicata inferred from molecular and morphological characters.* Molecular phylogenetics and evolution 25, 408–428, 2002.
- STAMATAKIS, A. *RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies.* Bioinformatics 30, 1312–1313, 2014.
- STEFANIAK, L. *Genetic conspecificity of the worldwide populations of Didemnum vexillum Kott, 2002.* Aquatic Invasions 4, 29–44, 2009.
- STEFANIAK, L., LAMBERT, G., GITTENBERGER, A., ZHANG, H., LIN, S. & WHITLATCH, R.B. *Genetic conspecificity of the worldwide populations of Didemnum vexillum Kott, 2002.* Aquatic Invasions 4, 29–44, 2009.
- TARJUELO, I., POSADA, D., CRANDALL, K.A., PASCUAL, M. & TURON, X. *Cryptic species of Clavelina (Ascidacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean.* Marine Biology 139, 455–462, 2001.
- TARJUELO, I., POSADA, D., CRANDALL, K. A., PASCUAL, M. & TURON, X. *Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian Pseudodistoma crucigaster.* Molecular ecology 13, 3125–36, 2004.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. *CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.* Nucleic Acids Research 22, 4673–4680, 1994.
- TOKIOKA, T. *Ascidians of Sagami Bay.* Tokko, Iwanami Shoten, 1–313, 1953.
- TOKIOKA, T. *Contributions to Japanese ascidian fauna VIII. Sporadic Memorandum.* Publications of Seto Marine Biological Laboratory Kyoto University 4, 239–264,

- 1954.
- TOKIOKA, T. *Pacific Tunicata of United States National Museum*. United States National Museum Bulletin 251, 1–247, 1967.
- TURON, X. *Ascidias del Cabo de Creus (Costa NE Española)*. Miscellania Zoológica 9, 265–271, 1985.
- TURON, X. *Morfología de las espículas en las especies de la familia Didemnidae (Asciadiacea) del litoral de Cataluña e Islas Baleares*. Miscellania Zoológica 10, 213–222, 1986.
- VANDEPAS, L.E., OLIVEIRA, L.M., LEE, S.S.C., HIROSE, E., ROCHA, R.M. & SWALLA, B.J. *Biogeography of Phallusia nigra: Is it really black and white?* Biological Bulletin 228, 52–64, 2015.
- VAN NAME, W.G. *The Ascidians of the Bermuda Islands*. Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences 11, 325–412, 1902.
- VAN NAME, W.G. *Ascidians of the West Indian region and Southeastern United States*. Bulletin American Museum of Natural History 44, 283–494, 1921.
- VAN NAME, W.G. *Ascidians from Curaçao*. Bijdragen tot der Kennis Dierkunde 23, 23–32, 1924.
- VAN NAME, W.G. *The North and South American ascidians*. Bulletin of the American Museum of Natural History 84, 1–476, 1945.
- WEIS, A. & MELZER, R.R. *How did sea spiders recolonize the Chilean fjords after glaciation? DNA barcoding of Pycnogonida, with remarks on phylogeography of Achelia assimilis (Haswell, 1885)*. Systematics and Biodiversity 10, 361–374, 2012a.
- WEISS, A. & MELZER, R.R. *Integrative taxonomy of Antarctic and Subantarctic sea spiders (Pycnogonida) using morphological and molecular methods*. Systematics and Biodiversity 10, 1–136, 2012b.
- ZHANG, J., KAPLI, P., PAVLIDIS, P. & STAMATAKIS, A. *A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements*. Bioinformatics 29, 2869–2876, 2013.